

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Inhibition de la réception des signaux de danger via les TLR TRIF-dépendants
dans les cellules dendritiques myéloïdes infectées avec le virus de l'hépatite C *in
vivo*: mécanisme d'évasion de l'immunité innée dans l'infection chronique**

Par

Ian Gaël Rodrigue-Gervais

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae ès doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie

Juillet 2008

© Ian Gaël Rodrigue-Gervais, 2008



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Inhibition de la réception des signaux de danger via les TLR TRIF-dépendants dans les cellules dendritiques myéloïdes infectées avec le virus de l'hépatite C in vivo: mécanisme d'évasion de l'immunité innée dans l'infection chronique

Présenté par :

Ian Gaël Rodrigue-Gervais

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur :	Hugo Soudeyns
Directeur de recherche :	Daniel Lamarre
Membre du jury :	Claude Perreault
Examineur externe :	Alain Lamarre
Représentant du doyen de la FES :	

Thèse acceptée le : _____

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS ET MOTS CLÉS

Résumé

Cette étude porte sur l'identification d'un réservoir extrahépatique du virus de l'hépatite C (VHC) exerçant une pression inhibitrice sur la fonction des cellules dendritiques myéloïdes (MDC) sanguines qui mène à l'échec de la réponse des lymphocytes T VHC-spécifiques à éradiquer l'infection chez l'être humain. Nous montrons par cytométrie polychromatique, par tri cellulaire ainsi que par RT-PCR quantitatif que les niveaux d'expression d'IL-12 et de TNF- α suivant l'engagement du TLR3 et du TLR4 sur les MDC corréleront négativement avec les niveaux d'ARN génomique du VHC présent dans les DC circulantes d'un sous-groupe de patients virémiques (CP-D). L'atténuation de la réponse innée n'est corrélée ni avec des déficits dans la fréquence des MDC chez ces patients, ni avec la virémie ou les niveaux d'ALT/AST. Pour démontrer que l'expression de la NS3/4A et la réplication virale interfèrent spécifiquement avec la fonction de l'adaptateur TRIF dans ces MDC de patients virémiques, des PBMC isolés ont été stimulés *ex vivo* pour une analyse longitudinale de la capacité des TLR3 et TLR4 (voie TRIF-dépendante) versus le TLR8 (MyD88-dépendante) à conduire à l'expression des gènes IL-12, IL-6, TNF- α , CD86, CD197 (CCR7), CD274 (PD-L1) dans des MDC exposés à des petites molécules inhibitrices du VHC. Ces expériences ont permis de montrer qu'il y a synthèse intacte de TNF- α et d'IL-12 suite à l'engagement du TLR8, contrairement au TLR3 et au TLR4, puisque seule la voie TRIF-dépendante n'est pas activée dans les MDC infectées. D'ailleurs, la restauration de la fonctionnalité du TLR4 par les antiviraux BILN-2061 (protéase) et VIR235 (polymérase) démontre que c'est l'activité protéolytique de la NS3 qui interfère avec l'activation de la voie TRIF dans ces MDC infectées. Nous montrons également que cette interférence spécifique induite par le virus ainsi que la surexpression de PD-L1 à la surface des MDC sont impliquées dans la faible qualité de la réponse des cellules CD8⁺ VHC-spécifiques. Ces résultats ouvrent la voie à un modèle de la persistance virale où une infection au sein des MDC présentant des antigènes du VHC est l'une des causes de la perte fonctionnelle des effecteurs CD8⁺ VHC-spécifiques. L'ensemble de ces résultats contribue à notre compréhension des mécanismes mis en œuvre par le VHC pour déjouer l'immunité innée et interférer avec le développement d'une réponse adaptative efficace, du moins pour ce qui est des CD8⁺ cytotoxiques. Cette compréhension pourra mener au développement d'interventions immunothérapeutiques visant à compenser ce déficit de la réponse innée; notamment le profil fonctionnel des MDC fournit une association claire avec l'issue virologique après thérapie antivirale IFN- α_2 , surtout dans les cas CP-N (où les MDC ont des fonctions TLR3/4 normales) qui éliminent leur virémie à la suite du régime thérapeutique contrairement aux CP-D.

Mots clés

Cellules dendritiques, VHC, TLR, TRIF, MyD88, CD8⁺ cytotoxiques, évasion, BILN2061.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS ET MOTS CLÉS

Summary

This study concerns the identification of a Hepatitis C virus (HCV) extrahepatic reservoir that exerts an inhibitory pressure on innate functions of myeloid dendritic cells (MDC), leading to the failure of HCV-specific T cell responses to eradicate infection in humans. We analyzed MDC functions in blood through the use of multiparametric flow cytometry, FACS cell sorting, unsupervised hierarchical clustering algorithms and quantitative RT-PCR. We observed clearly that MDCs from a subgroup of viremic patients (CP-D) displayed impaired TLR3- and TLR4-induced expression of interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor (TNF)- α in relation to cell-associated HCV genomic RNA copy density in DCs (negative correlation). Attenuation of innate sensing did not correlate with viremia, ALT/AST or deficits in circulating MDC frequencies in HCV-infected patients. To demonstrate that expression of the NS3/4A protease and viral replication interfere specifically with the function of the TRIF signaling adapter in this group of viremic patients, the capacity of TLR3 and TLR4 (TRIF-dependent pathway) versus TLR8 (MyD88-dependent) to drive the expression of IL-12, IL-6, TNF- α , CD86, CD197 (CCR7), CD274 (PD-L1) in MDCs exposed to chemically diverse small-molecule HCV antiviral inhibitors was analyzed longitudinally with *ex vivo* stimulated PBMCs. These experiments showed that CP-D patients maintain intact TLR8-receptor induced IL-12 and TNF- α production in the face of compromised TRIF-coupled pathway responsiveness. Furthermore, restoration of TLR4 responsiveness by BILN2061 (protease) and VIR235 (polymerase) antivirals demonstrates that HCV inactivates TRIF-coupled TLRs by NS3 protease-dependent processes in infected MDCs. Moreover, we show that virus-induced evasion of TRIF-dependent activation of innate immunity at the MDC level as well as surface upregulation of PD-L1 are involved in preventing the renewal of a functionally competent HCV-specific CD8⁺ T cell repertoire during chronic disease. These results open the way to a model of viral persistence where infection within MDCs presenting HCV antigens is one of the causes of the functional loss of HCV-specific CD8⁺ T cell immunity. This study contributes to our understanding of mechanisms implemented by HCV to thwart the innate immune response and interfere with the development of an effective adaptive response. This understanding of altered MDC innate sensing responses that contribute to defective antigen presentation during HCV infection could lead to immunotherapeutic approaches that compensate for the deficiency; notably the functional profile of MDCs provided a clear association with virological outcome after IFN- α_2 antiviral therapy, especially in the case of CP-N individuals (normal TLR3/4 functions) who experienced low levels of plasma viremia for extended periods off therapy in contrast to CP-Ds.

Keywords

Dendritic cells, HCV, TLR, TRIF, MyD88, CD8⁺ T cells, immune evasion, BILN2061.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé en français et mots clés	i
Résumé en anglais et mots clés.....	ii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles, abréviations et acronymes	viii
Remerciements.....	x
Avant-propos	xii
 Introduction.....	 1
 Chapitre I - Revue de la littérature.....	 6
1. Virus de l'hépatite C (VHC): structure, morphogénèse et cycle de vie.....	7
1.1 Bref aperçu du virus.....	7
1.1.1 Morphogénèse, enveloppes et assemblage	14
1.1.2 Tropisme cellulaire et récepteur.....	16
1.2 Structure/fonction de la NS2 et NS34A protéase	20
1.2.1 Au-delà de la fonction virologique des protéases: mécanisme d'interférence avec les voies de l'immunité innée antivirale.....	21
2. Principaux acteurs immunitaires lors de l'infection au virus de l'hépatite C	25
2.1 Réponse humorale et protection que confèrent les cellules B	26
2.2 Mémoire CD8 ⁺ requise pour une protection efficace contre une infection VHC persistante	27
2.2.1 Développement de la mémoire lors d'une infection virale.....	29
2.2.2 Réponse lymphocytaire CD8 ⁺ cytotoxique anti-VHC	35
2.3 Persistance de la virémie et évasion en l'absence d'une mémoire CD4 ⁺ auxiliaire	43
2.3.1 Le rôle des CD4 ⁺ dans l'obtention d'une mémoire CD8 ⁺ fonctionnelle	43
2.3.2 La réponse lymphocytaire CD4 ⁺ anti-VHC.....	45
3. Les cellules dendritiques: intermédiaires de l'immunité innée/acquise	47
3.1 Structure/fonction des TLR	49
3.1.1 TLR et immunité adaptative	54
3.2 Les cellules dendritiques: notions générales.....	54
3.2.1 Interaction cellule dendritique/lymphocyte T naïf.....	58
3.3 Les cellules dendritiques en tant que réservoir viral du VHC	59
3.3.1 Détection du génome viral: évidence d'une réplication virale dans les cellules dendritiques périphériques	61
4. Article de revue: <i>Les cellules dendritiques, acteurs immunitaires ou cibles du virus de l'hépatite C</i>	62
Page titre	64

Résumé.....	65
Introduction.....	65
Les cellules dendritiques: au carrefour de l'immunité innée/acquise.....	67
Les cellules dendritiques en tant que cibles du VHC	68
Détournement de la transduction des signaux de danger captés par des TLR dans les cellules dendritiques infectées	70
L'effet d'une infection des cellules dendritiques sur la réponse acquise.....	72
Conclusion	73
Remerciements.....	74
Abstract (anglais).....	74
Liste des références.....	75
5. Objet de la thèse.....	82
Chapitre II - Article scientifique 01: <i>Poly(I:C) and LPS innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in Hepatitis C virus-infected patients</i>	83
Contexte et portée	84
Présence de constituants viraux parmi les DC circulantes isolées de patients virémiques	84
Atténuation de la réponse au poly(I:C) et LPS dans les DC de patients virémiques: conséquence de la présence d'ARN génomiques du VHC	85
Conclusion	86
Page titre	87
Résumé.....	88
Introduction.....	88
Matériel et méthodes.....	91
Résultats.....	94
Discussion.....	100
Remerciements.....	103
Liste des références.....	104
Chapitre III - Article scientifique 02: <i>Pathogenic interplays between Hepatitis C virus, myeloid dendritic cells and virus-specific CD8⁺ T cell responses in chronically infected patients</i>	120
Contexte et portée	121
Page titre	123
Résumé.....	124
Introduction.....	124
Matériel et méthodes.....	128
Résultats.....	133
Discussion.....	143
Remerciements.....	152
Liste des références.....	152

Chapitre IV - Discussion et conclusion	177
1. Réservoir viral: infection des MDC par le VHC	180
2. Immunité innée et réservoir VHC dans les DC: un flirt bénéfique?.....	185
3. Conséquence(s) physiologique(s) sur la réponse adaptative, particulièrement la dimension CTL	188
4. La leçon des CP-N: prédire l'efficacité éventuelle des stratégies thérapeutiques antivirales en développement	193
5. Le foie: quand devoir de conciliation tolérance/immunité facilite la persistance du VHC	195
6. Conclusion	201
Bibliographie	204
Annexe	260

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau 1. <i>Phénotype, propriétés et fonctions effectrices des populations mémoires</i>	35
Tableau 2. <i>Caractéristiques des CD8⁺ VHC-spécifiques épuisés</i>	35
Tableau 3. <i>Phénotype et caractéristiques fonctionnelles des cellules présentatrices d'antigènes isolées de la périphérie</i>	56

Chapitre II

Table 4. <i>Clinical and demographic characteristics of the HCV-infected patients</i>	118
Table 5. <i>Oligonucleotides used for real-time RT-PCR Quantifications</i>	119

Chapitre III

Table 6. <i>Virological and immunological characteristics of the HCV-infected patients</i>	174
Table 7. <i>Patients with functionally characterized NS3- or NS5B-specific CD8⁺ T cell responses</i>	175
Table 8. <i>Patients included in study</i>	176

Annexe

Tableau 9. <i>Paramètres cliniques des patients étudiés en supplémentaires</i>	261
--	-----

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure 1. <i>Organisation et structure des protéines du VHC</i>	11
Figure 2. <i>Cycle de vie du VHC</i>	13
Figure 3. <i>Modèle d'entrée et de fusion du VHC dans une cellule hôte permissive</i>	19
Figure 4. <i>Protéase NS34A: antagoniste des voies de l'immunité innée antivirale</i>	24
Figure 5. <i>Différenciation de la mémoire lors d'infections virales</i>	33
Figure 6. <i>Régulation des signaux issus du TCR et de la costimulation CD28-dépendante par les récepteurs immunoinhibiteurs PD-1 et CTLA-4</i>	42
Figure 7. <i>Signalisation par les TLR</i>	53
Figure 8. <i>Voies de signalisation des TLR3 et TLR4</i>	81

Chapitre II

Figure 9. <i>HCV RNA contents in circulating immune blood cell subpopulations from viremic patients</i>	109
Figure 10. <i>MDCs display impaired response to poly(I:C) and LPS in viremic patients</i>	111
Figure 11. <i>Poly(I:C) and LPS responsiveness in MDCs is associated with HCV RNA levels in total DCs</i>	113
Figure 12. <i>Selective attenuation of poly(I:C) and LPS innate sensing in IL-6-expressing MDCs of CP-D viremic patients</i>	115
Figure 13. <i>Influence of HCV on peripheral blood DC subset frequencies</i>	117

Chapitre III

Figure 14. <i>TLR activation of MDCs varies among viremic patients and contrasts with that of aviremic and normal donors</i>	161
Figure 15. <i>Intact TLR7/8-activities in MDCs of CP-D viremic patients despite an established lack of response to agonists of TLR3 and TLR4 danger sensing pathways</i>	163
Figure 16. <i>Reversal of HCV-induced TRIF-dependent-inactivation in MDCs of CP-D patients by HCV antiviral inhibitors</i>	165
Figure 17. <i>Detectable HCV-specific CD8⁺ T cell responses in CP patient groups</i>	167
Figure 18. <i>Polyfunctional HCV-specific CD8⁺ T cells are prominent in CP-N patient group</i>	169
Figure 19. <i>PD-L1 is upregulated at the surface of MDCs and monocytes in chronic HCV-infected subjects</i>	171
Figure 20. <i>Markers of defective MDCs are associated with failure to produce IL-2 but not with IFN-γ production in HCV-specific CD8⁺ T cells</i>	173

Annexe

Figure 21. <i>Interaction spécifique entre le VHC et les cellules du système immunitaire</i>	263
--	-----

LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
ARN	Acide ribonucléique
ASGP-R	Récepteur aux asialoglycoprotéines
ASN	Asparagine
BCR	Récepteur de la cellule B <i>B cell receptor</i>
BDCA2	Blood dendritic cell antigen 2
CCL	Ligand d'un récepteur de chémokine <i>Chemokine receptor ligand</i>
CCR, CX ₃ CR	Récepteur de chémokine <i>Chemokine receptor</i>
CD	Antigène de différenciation <i>Cluster of differentiation</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CP	<i>Cytokine profile</i>
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CTL	Lymphocyte T cytotoxique <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
CTLA-	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen</i>
DEN	Virus de la Dengue
DNA	Acide désoxyribonucléique <i>Desoxyribonucleic acid</i>
EBV	virus d'Epstein-Barr
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
HLA	système CMH chez les humains <i>human leukocyte antigen</i>
hVAP	<i>Human vesicle-associated membrane protein-associated protein</i>
HVR1	Hyper variable region 1
ICOS	<i>Inducible cotimulator</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IPS-	<i>Interferon-β-promoter stimulator</i>
IRAK	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IRF	<i>IFN-regulatory factor</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
ITSM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LN	<i>Lymph node</i> Ganglion lymphatique
LPS	lipopolysaccharide
m.o.i.	Multiplicité d'infections <i>Multiplicity of infections</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>

MIIC	<i>Multivesicular major histocompatibility complex class II peptide-loading compartment</i>
MyD	<i>Myeloid differentiation factor</i>
NF	<i>Nuclear factor</i>
NK	<i>Natural Killer cells</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-/PD-L	<i>Program death receptor-ligand pair</i>
PG	prostaglandine
Poly(I:C)	<i>Polyriboinosinic polyribocytidylic acid</i>
PRR	<i>Pathogen recognition receptor</i>
PSGL-	<i>P-selectin glycoprotein ligand</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RHIM	<i>RIP-homotypic interaction motif</i>
RIG-I	<i>retinoic-acid inducible gene-1</i>
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
SHP	<i>Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase</i>
SR-B1	<i>Scavenger receptor B1</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAB	<i>TAK-1-binding protein</i>
TAK	<i>Transforming growth factor-β-activated kinase</i>
TBK	<i>TANK-binding kinase</i>
TCM	Lymphocyte T mémoire centrale
TCR	récepteur de la cellule T <i>T cell receptor</i>
TE	Lymphocyte T effecteur différencié
TEM	Lymphocyte T mémoire effecteur
TGF-	<i>Transforming growth factor</i>
T _H	type de cellule T auxiliaire <i>T helper cell</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VDBV	Virus de la diarrhée bovine virale
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHS	Virus de l'herpès simplex
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

REMERCIEMENTS

À mon directeur, Monsieur Daniel Lamarre, pour sa confiance, sa patience et pour l'estime dont il m'honore.

Je remercie les membres du jury: Monsieur Hugo Soudeyns, qui a bien voulu assumer la lourde tâche de rapporteur, ainsi que Messieurs Alain Lamarre et Claude Perreault qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail.

À l'INSERM et au FRSQ pour m'avoir soutenu financièrement au cours de mes études graduées.

À tous les collègues des disciplines variées et tout le personnel infirmier qui ont participé à ces études. Je voudrais exprimer ma gratitude à Sylvie Beaulieu pour m'avoir initié au travail sur les cellules dendritiques et à Maryse Lainesse de m'avoir formé à la discipline du travail en laboratoire BSL-P3 (et d'être une très patiente arbitre de joute).

À Hawley Rigsby qui a activement pris part à ce travail et qui est à présent une amie; avec une mention spéciale pour son humour et sa dérision.

À ceux qui ont rempli ces trois années de vie (en thèse), qui m'ont accueilli parmi eux et m'ont permis de manipuler dans d'excellentes conditions, rendant ainsi ce travail possible, mes collègues et amis du laboratoire du professeur D. Lamarre: Laurent Chatel-Chaix, Loubna Jouan, Pierre Melançon, et aussi Martin Baril ("étrange" de l'IRIC)... Merci pour vos qualités humaines, les passionnantes discussions sur le métro que nous avons eues et enfin pour l'indéfectible intérêt en ma vie sociale!

À mes collègues et amis immunologistes du laboratoire du professeur R.-P. Sékaly, qui a encadré une partie des travaux présentés ici: à tous ceux qui y vivent, et ceux qui y sont passés, notamment Marie-Lise Dion, Nicole Saba, Carmen Estrela, Justin Reis, Serena Reis, Frédéric Agnola, Casimiro Gerarduzzi, Thomas Démoullins, Marc Vendette, Catherine Isabelle, Luc English, Lena Kalfayan, Laurent Sabagh, Salah Aouad, Myriam Sylvestre, Jean-François Poulin, et à tout le petit monde de l'unité

NIML, qui rendent ce centre si attachant... Merci, pour les sourires, les repas bien arrosés pleins d'humour, et pour les petits jouets! Pour tous ces moments de joie qui ont soutenu ce travail.

À tous les gens de l'UdM et du CHUM que j'ai eu le plaisir de côtoyer.

À Geneviève Beulé et à Tanya Girard, précieuses amies qui ont rendu le labo moins vide quelques dimanches!

À mon amie Dominike Sauvé, pour sa bonne humeur, son optimisme, sa présence au quotidien, avec le vœu que ses futurs voyages soient fructueux.

À Karin qui s'est jointe à cette aventure vers sa fin, et qui me permet de pratiquer mon "Autrichien"!

À tous ceux et celles qui m'ont côtoyé d'un peu plus près pendant ces années et, en particulier, à ma famille et amis hors du labo, qui ont cru en moi sans retenue me permettant d'en arriver là à la fin.

AVANT-PROPOS

Articles joints à la thèse et contribution à titre d'auteur.

Rodrigue-Gervais IG et Lamarre D. 2007. Les cellules dendritiques, acteurs immunitaires ou cibles du virus de l'hépatite C. Soumis pour publication. (Chapitre I, section 4).

À titre d'auteur de cet article de revue sous la supervision du professeur Daniel Lamarre, j'ai effectué la synthèse de la littérature et rédigé l'article.

Rodrigue-Gervais IG, Jouan L, Beulé G, Sauvé D, Bruneau J, Willems B, Sékaly RP and Lamarre D. 2007. Poly(I:C) and LPS innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected *in vivo* in Hepatitis C virus-infected patients. *J. Virol.* 81:5537-46. (Chapitre II).

À titre d'auteur de cet article scientifique sous la supervision des professeurs Daniel Lamarre et Rafick-Pierre Sékaly, j'ai défini les objectifs, hypothèses et paramètres de l'article; développé le système du qRT-PCR ainsi que procédé aux essais de cytométrie en flux polychromatique; conceptualisé et exécuté les expériences pour les figures 10 à 13; participé à la figure 9 pour ce qui est de l'isolation des populations cellulaires triées; analysé les résultats et rédigé l'article.

Rodrigue-Gervais IG, Rigsby H, Jouan L, Sauvé D, Sékaly RP, Willems B and Lamarre D. 2008. Pathogenic interplays between Hepatitis C virus, myeloid dendritic cell functions and virus-specific CD8⁺ T cell responses in chronically infected patients. Soumis pour publication. (Chapitre III).

À titre d'auteur de cet article scientifique sous la supervision du professeur Daniel Lamarre, j'ai élaboré les objectifs et hypothèses de l'expérimentation; conceptualisé les expériences de toutes les figures et exécuté directement celles liées aux figures 14-16 et 19; participé aux expériences des figure 17, 18 et 20; développé les essais de cytométrie en flux polychromatique; analysé les résultats et rédigé l'article.

Articles non-joints à la thèse.

Rodrigue-Gervais IG, Rigsby H, Willems B and Lamarre D. Higher efficacy of Peg-IFN- α_2 ribavirin combined therapy in viremic patients with functional myeloid dendritic cells. En préparation.

Voisin L, Gopalbhai K, Julien C, Claveau I, Duhamel S, Saba-El-Leil MK, Rodrigue-Gervais IG, Bouchard A, Baccarelli A, Sauter G, Simon R, Gaboury L, Lamarre D, Basik M and Meloche S. 2008. Activation of MEK2 promotes colorectal cancer progression. Soumis pour publication.

Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. 2003. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100:2783-8.

«Il est bien des choses qui ne paraissent impossibles que tant qu'on ne les a pas tentées»

André Gide, *Si le grain ne meurt*, éd. Gallimard, 1997 (ISBN 2-07-036875-0), partie I, chapitre 3; p. 90.

INTRODUCTION

L'agent étiologique de l'hépatite C, virus à ARN monocaténaire de polarité positive appartenant à la famille des *Flaviviridae*, décrit pour la première fois en 1989 par l'équipe de M. Houghton (16, 94, 313), se transmet surtout par voie parentérale. Dans plus de 80% des cas, l'infection évolue vers une virémie persistante qui mène à des complications hépatiques (fibrose, cirrhose terminale) et à l'apparition d'hépatocarcinomes (401). Cela fait de l'hépatite C la première cause de transplantation du foie. La transplantation ne permet pas, toutefois, la guérison: la réinfection du greffon est quasi systématique et 90% des foies greffés présentent une récurrence histologique à cinq ans post greffe. L'infection au virus de l'hépatite C (VHC) pose donc un problème de santé publique d'une importance grandissante, affectant à ce jour 3% de la population mondiale et plus de 10% des populations de certains pays d'Afrique. Au Canada, même s'il n'existe pas de données exactes quant à sa prévalence, il est estimé par les Instituts de recherche en santé du Canada que ~242 000 personnes sont porteuses de ce virus, soit 0.8% de la population (voir *Initiative de recherche sur l'hépatite C de Santé Canada et des IRSC (2005)*; <http://www.cihr-irsc.gc.ca/f/4601.html>). La plupart des sujets infectés ne développent aucun symptôme durant les premières phases de l'hépatite C et il est plausible de croire que plus de la moitié des sujets atteints sont asymptomatiques, donc ignorants leur statut séropositif. L'administration du seul traitement antiviral disponible (une combinaison de l'IFN- α_{2a} pégylé, et d'un analogue nucléotidique, la ribavirine) permet la *clairance* complète et définitive chez environ 80% des patients infectés par un génotype 2 ou 3, mais seulement chez la moitié de ceux infectés par un virus de génotype 1 (381). Par ailleurs, les effets secondaires importants de ce traitement rendent impérative la découverte de molécules et vaccins à visée thérapeutique plus spécifique.

Bien que l'infection au VHC soit l'une des maladies infectieuses chroniques les plus répandues, sa pathogénèse ainsi que les mécanismes responsables de la persistance virale restent encore mal compris. Cette infection est caractérisée par une interaction entre le virus et la réponse immunitaire de l'hôte infecté. De fait, la réponse adaptative joue un rôle majeur au cours de la phase aiguë pour assurer l'éradication de la virémie

et la guérison spontanée dans 20% des cas. Cette guérison est obtenue grâce à une réponse lymphocytaire T CD4⁺ VHC-spécifique, à condition qu'elle soit de diversité épitopique suffisante et associée à un profil sécrétoire de type T_H1. En effet, un déficit fonctionnel de cette réponse pourrait expliquer la persistance virale. Dans ce cas, le développement de l'hépatite chronique intervient malgré la présence d'une réponse lymphocytaire T cytotoxique CD8⁺ spécifique du VHC forte et compartimentée au niveau hépatique. Or, une dysfonctionnalité du rôle de l'immunité innée (notamment celui des cellules dendritiques, [DC]) dans le cadre de l'infection au VHC a été proposée pour expliquer la perte des réponses T CD4⁺ VHC-spécifique chez les sujets progressant vers la forme chronique de l'infection. De récentes études ont mis en évidence que le VHC échapperait à la détection par l'immunité innée en bloquant l'induction d'IFN par l'action antagoniste de sa protéase NS3/4A sur les adaptateurs de signalisation recrutés lors de la reconnaissance du génome du VHC par le TLR3 et l'hélicase cytosolique RIG-I (178). Des travaux récents ont, de plus, fait apparaître la nécessité qu'ont les acteurs du système inné (ex. les DC) de posséder des TLR fonctionnels pour générer une mémoire adaptative protectrice. La perte de la réceptivité des TLR dans les DC infectées représenterait donc un mécanisme spécifique qui constituerait à lui seul un élément permettant de rendre compte de la perte de la mémoire VHC-spécifique observée dans l'infection.

Les études publiées afin de mettre en lumière des preuves de l'existence d'un réservoir viral dans les DC qui perturbe leurs fonctions en tant que sentinelles du système inné et sa contribution à un défaut de présentation aux lymphocytes T n'ont donné lieu qu'à des résultats controversés. Aux yeux d'un grand nombre de chercheurs, le réservoir dans les DC pour le VHC ne représenterait que des sites d'accumulation de particules virales par phagocytose plutôt que de véritables sites activement ciblés. Les niveaux d'ARN du VHC associé aux DC sont bas, au-dessous d'une copie par cellule quand la quantification est rapportée (444). Par ailleurs, aucun ARN VHC n'est détecté dans des DC préparées *in vitro* à partir de monocytes de chimpanzés chroniquement infectés, utilisant un essai avec une sensibilité de 2 500 copies d'ARN virale par 10⁶ Mo-DCs. Toutefois, il est bon d'insister sur le fait que, contrairement à l'homme, la persistance d'une infection VHC chez le chimpanzé est

moins fréquente et, lorsqu'elle a lieu, celle-ci est associée à des lésions hépatiques de moindre sévérité et ne corrèle pas dans l'absolu avec la qualité de la réponse adaptative. De façon intéressante, la présence d'ARN génomiques et antigénomiques a été détectée parmi les DC directement isolées (sans manipulations *in vitro*) de patients chroniquement infectés. Cependant, le rôle que ce virus cantonné dans les DC joue sur les capacités fonctionnelles de ces cellules et le degré de restauration de celles-ci dans des cellules ne contenant pas de virus ne sont toujours pas élucidés. Aussi, la caractérisation *in vivo* des réservoirs viraux d'origine DC s'avère encore nécessaire aujourd'hui pour une compréhension de la pathogénèse de l'hépatite C puisque une telle approche devrait donner des indices concernant les mécanismes qui sous-tendent l'évolution des réponses inadéquates au niveau des lymphocytes T VHC-spécifiques qui sont associés avec l'incapacité de l'hôte à éradiquer l'infection.

En ce sens, l'objectif de la recherche présentée dans cette thèse, rédigée par article, a été d'identifier la présence d'un réservoir VHC extrahépatique chez les DC de type myéloïde en circulation dans le sang. L'existence d'un tel réservoir ouvre la voie à un modèle de la persistance virale où une infection au sein des DC présentant des antigènes du VHC pourrait être l'une des causes de la perte fonctionnelle des effecteurs CD4/CD8 VHC-spécifique. L'approche expérimentale retenue dans le cadre de cette recherche doctorale a consisté à développer dans un premier temps des outils quantitatifs (i.e. PCR en temps réel, cytométrie intracellulaire) qui ont permis par la suite de déterminer, à partir d'échantillons sanguins prélevés chez des patients chroniquement infectés, qu'il y avait constitution d'un réservoir important au plan immunologique au sein des DC périphériques. Le premier chapitre de cette thèse consiste en une revue de la littérature décrivant les principaux acteurs immunitaires lors de l'infection au VHC ainsi que les mécanismes d'interférence supposés agir sur les fonctions innées des DC. Le contenu de ce chapitre s'appuie en partie sur un article soumis à la revue Médecine/Sciences sous le titre *Les cellules dendritiques, acteurs immunitaires ou cibles du virus de l'hépatite C*. Les chapitres suivants reproduisent deux articles scientifiques qui font état des résultats obtenus au cours de cette recherche en ce qui a trait à la caractérisation de l'interaction particulière du virus avec les DC circulantes et de la conséquence négative de celui-ci sur leurs

fonctions innées ainsi que sur leurs capacités à stimuler une réponse adaptative antivirale (notamment en ce qui a trait à la qualité des effecteurs CD8⁺ cytotoxiques). Le premier de ces deux articles a été publié dans la revue *Journal of Virology* et le second, paraissant sous forme de manuscrit, sera soumis à la revue *Journal of Experimental Medicine*. Enfin, le chapitre IV présente les éléments de discussion qui permettent de répondre de manière adéquate à la problématique retenue dans le cadre de cette recherche. Ces travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels l'immunité innée de l'hôte (au plan des DC) ne réussit pas à le défendre contre le VHC et ouvre ainsi la porte à de nouvelles avenues thérapeutiques.

CHAPITRE I
REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. VIRUS DE L'HÉPATITE C: STRUCTURE, MORPHOGENÈSE ET CYCLE DE VIE

Dans les années 1970, les cas d'hépatites post-transfusionnelles (HPT) étaient extrêmement répandus. La découverte des virus de l'hépatite B (VHB) en 1968 (468) et de l'hépatite A (VHA) en 1973 (162) a abouti à la mise en place de tests de détection de ces deux virus responsables de 25% des HPT. Les 75% restant, dont on ignorait toujours l'origine étiologique, ont été nommés hépatites non A-non B (NANB). Après des tentatives infructueuses, c'est l'obtention d'un ADN complémentaire (ADNc), dérivé du génome viral responsable de l'hépatite NANB, provenant du sang d'un chimpanzé infecté expérimentalement par le sérum d'un patient présentant un titre viral inhabituellement élevé, qui a permis à Choo et ses collaborateurs (94) de mettre en évidence pour la première fois, en 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) (309, 313) et de classer celui-ci au sein de la famille des *Flaviviridae* (genre *Hepacivirus*).

L'objectif de la section 1.1 est de décrire brièvement la famille taxonomique à laquelle appartient le VHC afin de montrer qu'il existe d'étroites similarités entre les cycles de réplication des virus de cette famille, notamment dans l'assemblage des particules virales au sein du réticulum endoplasmique (RE). La section 1.2 a pour but d'illustrer comment les protéines non-structurales du VHC interagissent entre elles et avec certaines composantes de l'hôte afin d'assurer la réplication virale, mais que leurs rôles vont également au-delà de la fonction virologique classique (réplication virale) en permettant la résistance du virus à l'immunité innée antivirale qui se constitue dans une cellule hôte infectée.

1.1 Bref aperçu du virus

La famille des *Flaviviridae* regroupe des virus enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive, long de 9.5 à 12.3 kb, ne codant que pour un seul cadre de lecture ouvert flanqué par deux régions non codantes (UTR) en 5' et 3'. Trois genres constituent cette famille. Le genre des flavivirus qui comprend, entre autre, le virus de la fièvre de dengue (DFV) et le virus du Nil occidental (WNV), celui des pestivirus qui inclut le virus de la diarrhée bovine

(VDBV), un virus souvent utilisé comme modèle d'étude du VHC et, enfin, le genre des hépacivirus qui comprend notamment les six génotypes et plus de 70 sous-types du VHC (72, 551). Le VHC partage une homologie séquentielle et structurale avec le flavivirus DFV et les pestivirus (407).

Le génome de la souche New Guinea-C DFV2 fait 10.7 kb et, contrairement au VHC et aux pestivirus, contient une coiffe de type 1 pour l'initiation de la traduction à l'extrémité 5' mais sans poly(A) en 3' (84, 250). La région 5'UTR du VHC comporte 341 nucléotides couvrant quatre domaines riches en structures tiges-boucles (dénotés I à IV), les domaines II, III, IV formant le site interne d'entrée du ribosome (IRES) (371, 602), structure qui fixe la sous-unité 40S du ribosome et permet ainsi l'initiation de la traduction du cadre de lecture unique de 3420-30 acides aminés selon le génotype considéré (37, 370, 372, 373). La région 3'UTR comporte une région poly(U/C) suivie d'une région conservée de 98 nucléotides repliée en trois tiges-boucles successives, connue sous le nom de région X (408), qui, au cours de la réplication, est nécessaire à l'initiation de la synthèse transcriptionnelle du brin d'ARN anti-sens par l'ARN polymérase ARN-dépendante. Cette dernière synthétise un brin d'ARN de polarité négative à partir du génome qui sert par la suite de matrice pour la transcription de nombreux brins d'ARN génomiques qui seront soit encapsidés et enveloppés pour devenir les génomes des particules virales néoformées, soit serviront de messagers pour la traduction de nouvelles protéines virales (39, 364).

La région codant les protéines de structure est située en 5' et précède les séquences codantes pour les protéines non-structurales (NS) qui assurent les fonctions enzymatiques essentielles à la réplication du génome viral. La polyprotéine résultante est clivée par des signalases cellulaires (140, 518) et par les protéases du virus (139, 200) en dix protéines virales dans l'ordre qui suit: NH₂ Core-E1-E2p7-NS2NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B COOH (Figure 1) (485). Core est considérée comme la protéine formant la nucléocapside et E1 (gp31) ainsi que E2 (gp70) sont les glycoprotéines transmembranaires de type I pH-dépendante constituant l'enveloppe virale. La gp31 porterait le peptide d'ancrage requis à la fusion de l'enveloppe virale avec l'endosome après endocytose (166), alors que la gp70 est impliquée au niveau de

la reconnaissance extracellulaire du récepteur et de l'attachement des particules (466). Un changement -2/+1 dans le cadre de lecture au 11^e codon de la Core mène à la synthèse de la protéine F (pour *frameshift*) de 17 kDa dont la demie vie est < 10 minutes *in vitro* (650, 651) et pour laquelle aucune fonction essentielle n'a été présentement identifiée. Toutefois, la présence d'anticorps anti-F (301) ainsi qu'une réponse dirigée contre des épitopes 9-mer (30) suggèrent un rôle probable de cette protéine dans le cycle viral.

Les protéines non-structurales sont clivées par les deux protéases virales, d'une part la protéase NS2-NS3 dotée d'une activité autocatalytique en *cis* permettant le clivage NS2-NS3 (198) et d'autre part, la sérine protéase NS3 qui, associée à son cofacteur NS4A, assure le clivage de l'ensemble des jonctions situées en aval (413). Ces dernières font d'ailleurs l'objet de la section 1.2. L'ARN polymérase NS5B (protéine de 68 kDa) ainsi que les autres protéines non-structurales s'associent à des protéines cellulaires de l'hôte comme hVAP-33 (180) pour former un complexe de réplication (253, 541) qui, en continuité avec la membrane du RE, réside dans des structures membranaires péri-nucléaires parfois circonvoûtées en association avec des gouttelettes lipidiques (6, 148, 150, 194). Ces modifications ultrastructurales où siège la réplication virale pourraient être également le site du clivage de la polyprotéine et de l'assemblage des virions (Figure 2) (412).

Figure 1. *Organisation et structure des protéines du VHC*. Modifié de Moradpour *et al.* (413). Le génome du VHC est représenté: les structures secondaires des régions 5' et 3' non codantes (NCR) ainsi que l'élément répliatif *cis* NS5B-stem loop 3 (5B-SL3) juxtaposent le cadre de lecture ouvert; cette tige-boucle SB-SL3 (la partie 3.2) nécessaire à la réplication (661) s'apparie spécifiquement avec la région 3'X (173). La traduction se fait par un mécanisme d'entrée interne du ribosome au niveau de l'IRES (I-VI) et produit une polyprotéine précurseur dont la maturation post-traductionnelle, qui se fait au niveau du réticulum endoplasmique (ER), conduit à la libération des protéines virales structurales (capside [core], E1 et E2), de la viroporine p7 et des protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Les points verts montrent les sites de N-glycosylation sur les enveloppes E1 et E2 (4 et 11 sites respectivement; souche H de génotype 1a, GenBank AF009606). Le losange ouvert représente le site de clivage par la signal peptide peptidase (illustré par un ciseau) qui a lieu au niveau de la capsid; les losanges solides dénotent un site de clivage par les signalases du réticulum endoplasmique (ER). Le clivage autocatalytique en *cis* NS2-NS3 est présenté par la flèche cyclique; les flèches droites indiquent les sites de *processing* en aval par le complexe protéasique NS3/4A. Le domaine catalytique de la NS2 est montré sous forme de dimère: l'un des monomère en bleu, l'autre en magenta, connecté à la membrane du ER par leur extrémité N-terminale (voir la section 1.2). Le domaine sérine protéase de la NS3 (bleu pâle) est montré associé avec le cofacteur NS4A (en jaune); la triade catalytique (His⁵⁷, Asp⁸¹ et Ser¹³⁹) est illustré par des sphères de couleur magenta. Les domaines hélicase I, II et III de la NS3 sont colorés argent, rouge et bleu foncé respectivement.

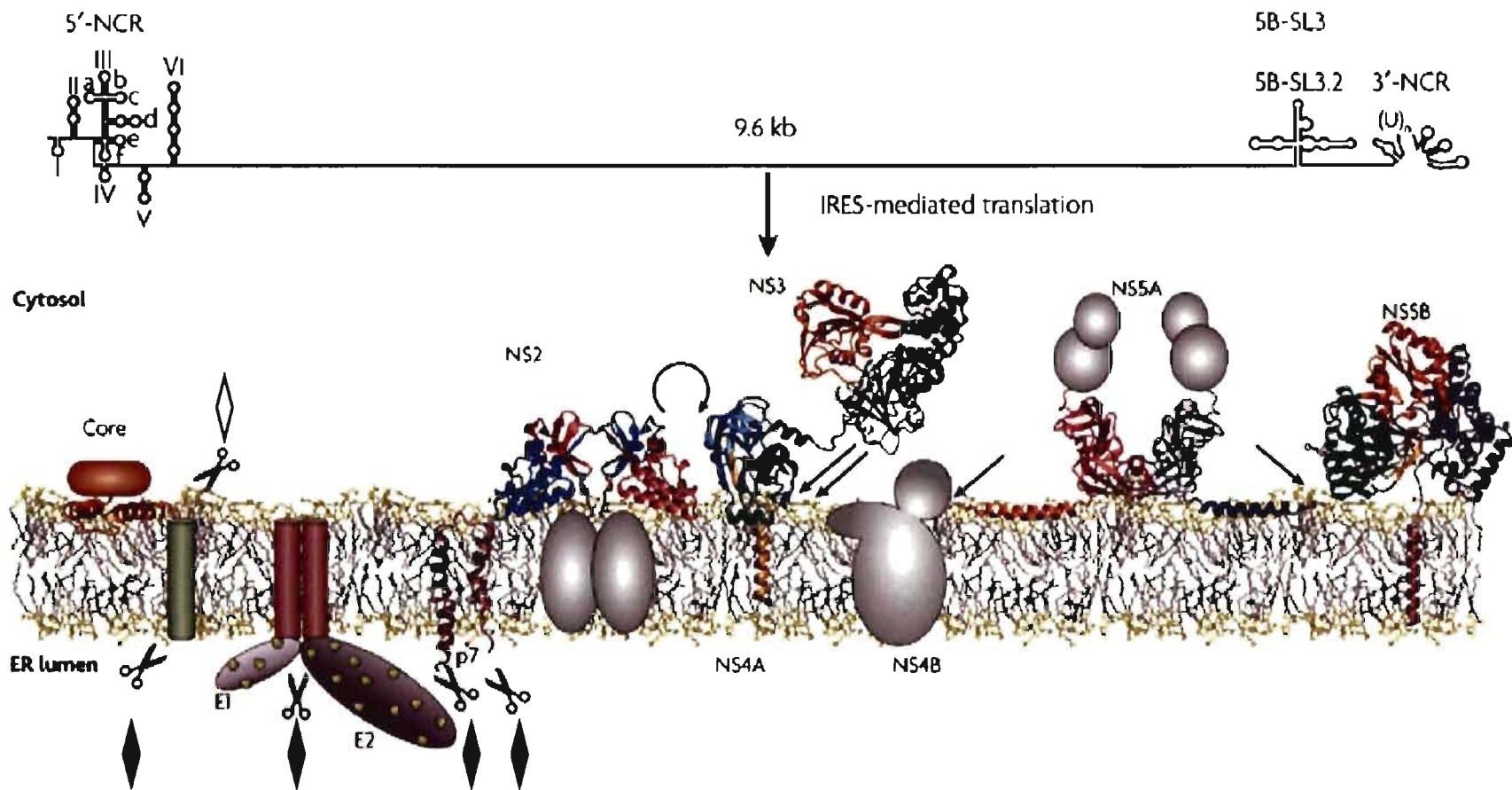
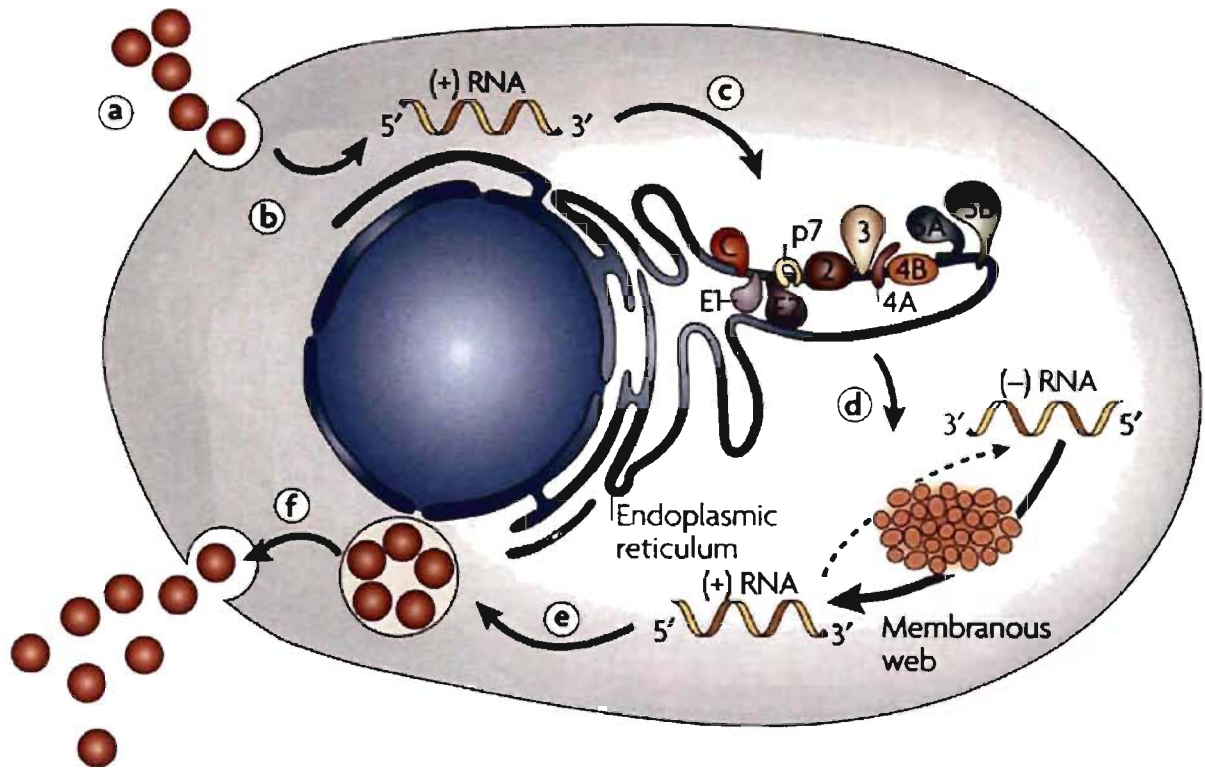


Figure 2. *Cycle de vie du VHC*. Modifié de Moradpour *et al.* (413). Par analogie avec les *Flaviviridae*, on suppose qu'après l'endocytose (a), les génomes viraux sont libérés de leurs enveloppes dans des compartiments acides de type endosomes, puis largués dans le cytoplasme où ils vont servir d'ARN messagers pour la synthèse et la maturation post-traductionnelle des protéines virales (b-c) ainsi que de matrices pour la réplication. L'ARN polymérase dépendante de l'ARN NS5B, associé aux structures membranaires et vésiculaires péri-nucléaires, synthétise un brin d'ARN négatif à partir du génome (d), qui sert ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins d'ARN positifs qui seront encapsidés et enveloppés pour devenir les génomes des particules virales néoformées (e) ou serviront de nouveaux messagers pour la synthèse des protéines virales. L'assemblage est probablement déclenché par l'interaction entre l'ARN génomique et la protéine de capsid, qui aboutit à la formation de la nucléocapside par des mécanismes non encore élucidés. Les nucléocapsides pourraient ensuite s'envelopper par bourgeonnement à l'intérieur du réticulum endoplasmique et les particules virales pourraient être excrétées par exocytose (f).



1.1.1 *Morphogénèse, enveloppes et assemblage*

Jusqu'à tout dernièrement, l'étude de la morphogénèse du VHC était freinée par le fait qu'il n'existait aucun système cellulaire *ex vivo* capable de propager efficacement le virus en culture (358). Toutefois, l'infection d'hépatocytes de chimpanzés et l'accès à des biopsies de foies humains infectés a permis d'observer, par microscopie électronique et immunomarquage, la présence d'une particule sphérique à symétrie icosaédrique de 55-65 nm de diamètre, contenant une nucléocapside interne de 30 nm entourée d'une membrane lipidique dérivée du RE qui, contrairement aux flavivirus (311, 416), présenterait à sa surface des projections épineuses, les enveloppes virales (120, 252, 348, 542, 563). Le système JFH-1, qui permet la production de particules virales infectieuses en culture cellulaire (VHCcc, (356)) et chez le chimpanzé (357, 621) à partir d'une souche 2a associée à une hépatite fulminante, a confirmé les observations précédentes. À l'exception de l'assemblage des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, aucune donnée définitive n'est présentement disponible sur l'assemblage de la particule virale (surtout l'encapsidation) et le relargage des virions de la cellule infectée, et ce malgré l'existence du système VHCcc. Cependant, la formation des complexes de glycoprotéines d'enveloppe ayant lieu dans le RE comme pour les flavivirus, il est probable que le VHC suit le même schéma qu'eux et bourgeonne dans le RE pour suivre ensuite la voie sécrétoire via l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique (375).

Ces connaissances sont exposées en détail dans plusieurs articles récents (138, 438). Il a ainsi été montré que les protéines E1 et E2 étaient dirigées, au cours de leur synthèse, vers la lumière du RE. En effet, l'extrémité C-terminale hydrophobe de la capsidite sert de séquence signal au précurseur E1-E2-p7-NS2 et déclenche sa translocation dans le RE. Ce précurseur est libéré de son peptide signal, et la capsidite est libérée de son extrémité C-terminale ancrée dans la membrane du RE (393), par des signal peptidases du RE. Une fois clivées, les protéines E1 et E2 s'assemblent en hétérodimères et leurs domaines TM jouent un rôle important dans cette interaction. Les protéines E1 et E2 sont modifiées par des N-glycosylations au cours de leur formation dans le RE. Elles possèdent 4-6 et 11 sites potentiels respectivement. Cinq

des six sites potentiels sont utilisés sur la protéine E1, selon le génotype. Cependant, exprimée seule, E1 n'est qu'incorrectement glycosylée, ce qui suggère la présence d'une séquence peptidique en aval nécessaire à sa glycosylation. L'état de glycosylation effectif de la protéine E2 n'a pas été élucidé, mais les analyses de déglycosylation ont montré que la plupart des sites (11 dénombrés dont 9 très conservés) sont certainement utilisés (189). L'état de la glycosylation peut jouer un rôle dans la reconnaissance des récepteurs cellulaires, qui restent mal identifiés, tel que l'illustre si bien le cas de DFV où l'utilisation différentielle du site de N-glycosylation Asn153/154 commun à tous les flavivirus explique le tropisme cellulaire de ses quatre sérotypes. Aussi, tandis que les enveloppes E des sérotypes 1 et 3 de DFV sont glycosylées en Asn 67 et 153, celles des types 2 et 4 ne sont glycosylées qu'à l'Asn 67. À m.o.i. égales, Navarro-Sanchez *et al.* (421) observent une diminution drastique du pouvoir infectieux de DFV de types 2 et 4 sur des DC CD209⁺ (DC-SIGN). Il semble donc que la glycosylation en Asn 153 soit importante pour une haute affinité avec le récepteur CD209 et l'infection de ce type cellulaire. La signification de ces résultats pour le tropisme du VHC à l'égard des DC sera discuté plus en détail à la section 4.

En définitive, l'association des protéines structurales avec la membrane du RE, en particulier l'orientation des protéines d'enveloppe E1 et E2 et leur topologie dans la bicouche lipidique, suggère un assemblage de la nucléocapside à la face cytosolique de la membrane du RE suivi du bourgeonnement de la particule dans la lumière du RE permettant l'acquisition de l'enveloppe.

1.1.2 *Tropisme cellulaire et récepteur*

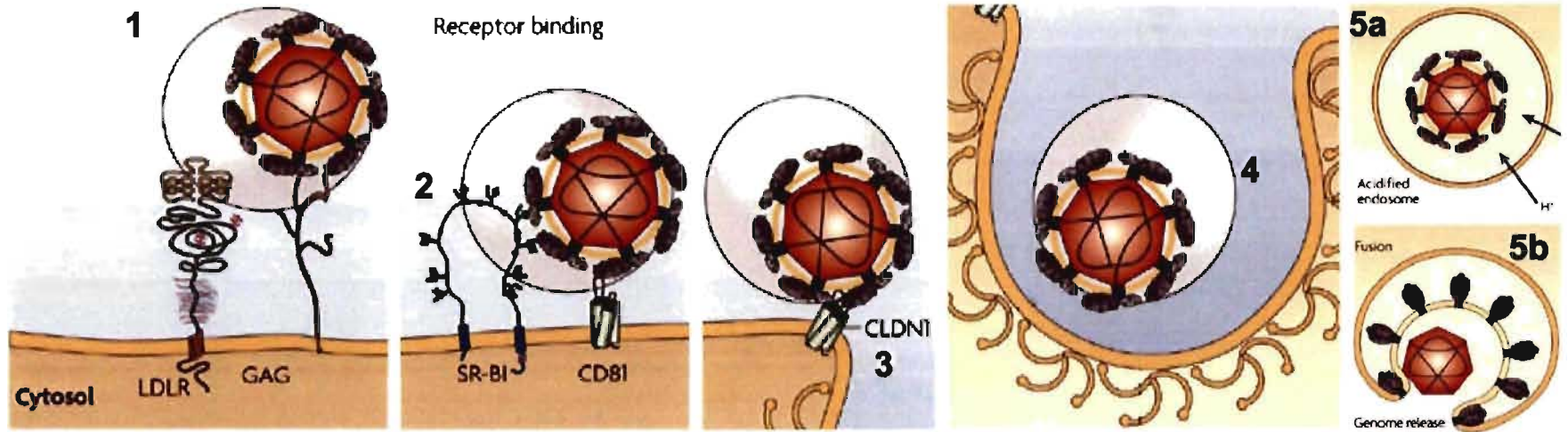
Puisque nous avons détaillé les enveloppes E1E2 du VHC, il est pertinent d'aborder la question du récepteur d'entrée ainsi que le tropisme (hôte cellulaire de ce virus). Le récepteur spécifique du VHC n'est pas identifié. Plusieurs molécules membranaires sont considérées comme des récepteurs putatifs du VHC. Les glycosaminoglycane sont des chaînes polysaccharidiques linéaires et sulfatées présentes dans de nombreux tissus et il a été rapporté que le VHC pourrait se fixer aux PBMC par l'intermédiaire de celles-ci (103). Le récepteur LDL est présent à la surface de la membrane

cellulaire de tous les tissus, surtout dans le foie. Le virus est associé aux LDL dans le plasma et le VHC complexé aux LDL peut être endocyté par les récepteurs des lipoprotéines (5). La protéine CD81, de la superfamille des tétraspanines, est exprimée à la surface de nombreuses cellules (345). Sur les lymphocytes B, le complexe CD19-CD21-CD81 Leu-13 joue un rôle dans l'activation cellulaire (125, 160). Sur les lymphocytes T, CD81 s'associe au CD4⁺ et au CD8⁺ et déclenche un signal de costimulation avec CD3 (616, 645). La glycoprotéine E2 se lie au CD81 (502) à la boucle LEL sur une surface de 805 Å² et nécessite la présence de quatre résidus conservés (Ile¹⁸², Phe¹⁸⁶, Asn¹⁸⁴, et Leu¹⁶²) (137); sur les DC ce récepteur putatif est localisé à la membrane plasmique en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-II (151, 411). Bartosch *et al.* (34) ont étudié l'entrée du virus dans les cellules grâce à des pseudoparticules virales porteuses d'un complexe glycoprotéique E1E2 fonctionnel (modèle VHCpp). Ils ont confirmé que l'entrée du virus était dépendante du pH, impliquant la voie de l'endocytose. Ces auteurs (35) font l'hypothèse que le VHC s'attacherait au CD81 par l'intermédiaire de la glycoprotéine d'enveloppe virale E2 et qu'il serait internalisé dans la cellule cible par le biais d'une interaction avec SR-B1 (Cla-1) (79, 520).

Hu *et al.* (243) ont publié des résultats en concordance avec cette ligne de pensée, c'est-à-dire que le pouvoir infectieux du VHC nécessiterait la co-expression de E1 et E2, serait pH-dépendant (599) et la molécule CD81 (7, 304) ne serait qu'une sous-unité d'un complexe de récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée clathrine-dépendent (Figure 3) (53). En effet, la mutation des acides aminés du LEL connus pour empêcher la liaison E2-CD81 réduit sans toutefois abolir l'infectivité du système JFH-1 comme source de virions infectieux (167). Le SR-B1, co-récepteur avec CD81 (665), est exprimé sur les monocytes et les DC myéloïdes (71). Cependant, la large distribution de ces récepteurs (exemple CD81) n'explique pas le tropisme restreint du VHC et permet de supposer qu'il existe un ou des récepteurs plus spécifiques et que l'interaction avec ces multiples récepteurs non spécifiques concentrerait le virus à la surface cellulaire et augmenterait la probabilité de fixation aux récepteurs spécifiques, permettant l'internalisation du virus. Ainsi, dans le foie, le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R), appelé aussi lectine hépatique (519),

présent uniquement sur les hépatocytes, et la protéine de jonction sérée Claudin-1 (CLDN1), dont l'expression stable dans des cellules non permissives les rend sensibles à l'infection par le VHCcc (154), seraient justement des candidats de récepteur spécifique. De façon intéressante, CLDN1, fortement exprimée dans le foie, est présente sur les DC myéloïdes (490, 574, 673); récemment, CLDN6 et 9 ont été rapportés comme étant importants dans le tropisme du VHC pour les PBMC (670).

Figure 3. *Modèle d'entrée et de fusion du VHC dans une cellule hôte permissive.* Modifié de Moradpour *et al.* (413). Une interaction précoce entre la surface des glycoprotéines d'enveloppe et les glycosaminoglycanes (GAG) situés à la surface des cellules cibles pourrait être impliquée dans la reconnaissance et la concentration du virus à la surface cellulaire (1) de tel sorte à augmenter la probabilité de fixation à la (ou les) molécule(s) réceptrice(s) responsable(s) de la fixation et de l'internalisation du VHC. Les virions infectieux pourraient également se fixer spécifiquement au récepteur des LDL (LDLR), sans doute par le biais de leur interaction de surface avec les VLDL et les LDL, et cette fixation serait associée à une internalisation des particules virales par plusieurs molécules formant le complexe récepteur (2-3): CD81, SR-BI et Claudin-1 (CLDN1). L'entrée du virus serait méditée par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendent (4, (53)), suivi d'une étape de fusion avec un compartiment endosomal intracellulaire acide (pH <5) (5a, (599)) qui permet le relargage du génome viral encapsidé dans le cytoplasme (5b).



1.2 Structure/fonction de la NS2 et NS3/4A protéase

La protéine NS2, de 23 kDa, est la première protéine non structurale du génome. Elle est ancrée dans la membrane du RE, ses extrémités NH₂ et COOH étant dans la lumière. Son rôle principal est de cliver la jonction NS2/NS3 en association avec NS3 lors des modifications post-traductionnelles de la polyprotéine. En effet, le clivage autocatalytique 2/3 a lieu entre les acides aminés 898 et 1207 et implique un mécanisme zinc dépendant ainsi que la formation d'un homodimère (comportant deux sites actifs) entre deux polyprotéines (368). Pour chaque site actif, les résidus catalytiques histidine et glutamate sont apportés par l'extrémité C-terminale d'un monomère, alors que la cystéine nucléophile est portée par l'extrémité C-terminale du second. Une grande proximité entre les extrémités C-terminales des deux monomères est donc nécessaire pour que la protéase soit active. Après clivage, les extrémités C-terminales du dimère s'éloignent, ce qui implique que l'activité protéase est perdue après le clivage de la jonction NS2/NS3. On ne sait pas à l'heure actuelle si le zinc joue un rôle catalytique ou structural dans ce processus. Néanmoins, un site de liaison au zinc a été identifié dans la région de NS3 impliquée dans cette activité protéase et des analyses cristallographiques et biochimiques ont suggéré que le zinc était essentiel pour l'intégrité de la structure protéique de NS3 et donc pour son activité sérine/protéase (119).

La NS3 est une protéine d'approximativement 70 kDa. Sa partie N-terminale (1/3 de la protéine) est impliquée dans le processus d'autoprotéolyse NS2/NS3 mais aussi dans le clivage en *trans* de toutes les autres protéines non-structurales: c'est sa fonction sérine protéase. Elle est efficace uniquement en présence de NS4A qui joue le rôle de cofacteur (607, 646). Cette dernière interagit avec l'extrémité N-terminale de NS3 pour former une structure hétérodimérique stable et fonctionnelle (155, 576). Le domaine protéase est conformé comme un site actif de type chymotrypsine, avec deux feuilletts β à l'interface desquels sont situés les résidus classiques du site actif des protéases à sérine (His, Asp, Ser) (130). La poche du site actif de la protéase, particulièrement peu profonde, nécessite des substrats présentant une grande surface d'interaction. Cette caractéristique (381) a compliqué la mise au point d'inhibiteurs

spécifique de l'activité protéasique (exemple BILN 2061, (319)), mais expliquerait pourquoi NS3 possède une telle variété de substrats. En effet, en plus du clivage des jonctions entre les protéines virales de NS3 à NS5B, la protéase clive au moins deux composants cellulaires appartenant à la voie de signalisation détectant l'ARN double brin: TRIF (164) et Cardif/IPS-1/MAVS/VISA (92) (voir section 1.2.1). Les deux tiers C-terminal restant ont un rôle nucléoside triphosphatase (NTPase)/hélicase, essentiel à la réplication virale (576). L'activité NTPase est augmentée lors de la fixation de NS3 sur une région poly(U) de la portion 3' noncodante de l'ARN génomique. Tel qu'abordé, il existerait une dernière fonction de NS3/4A qui consisterait à interagir directement avec certaines protéines cellulaires de l'hôte pour assurer une résistance contre les voies antivirales innées.

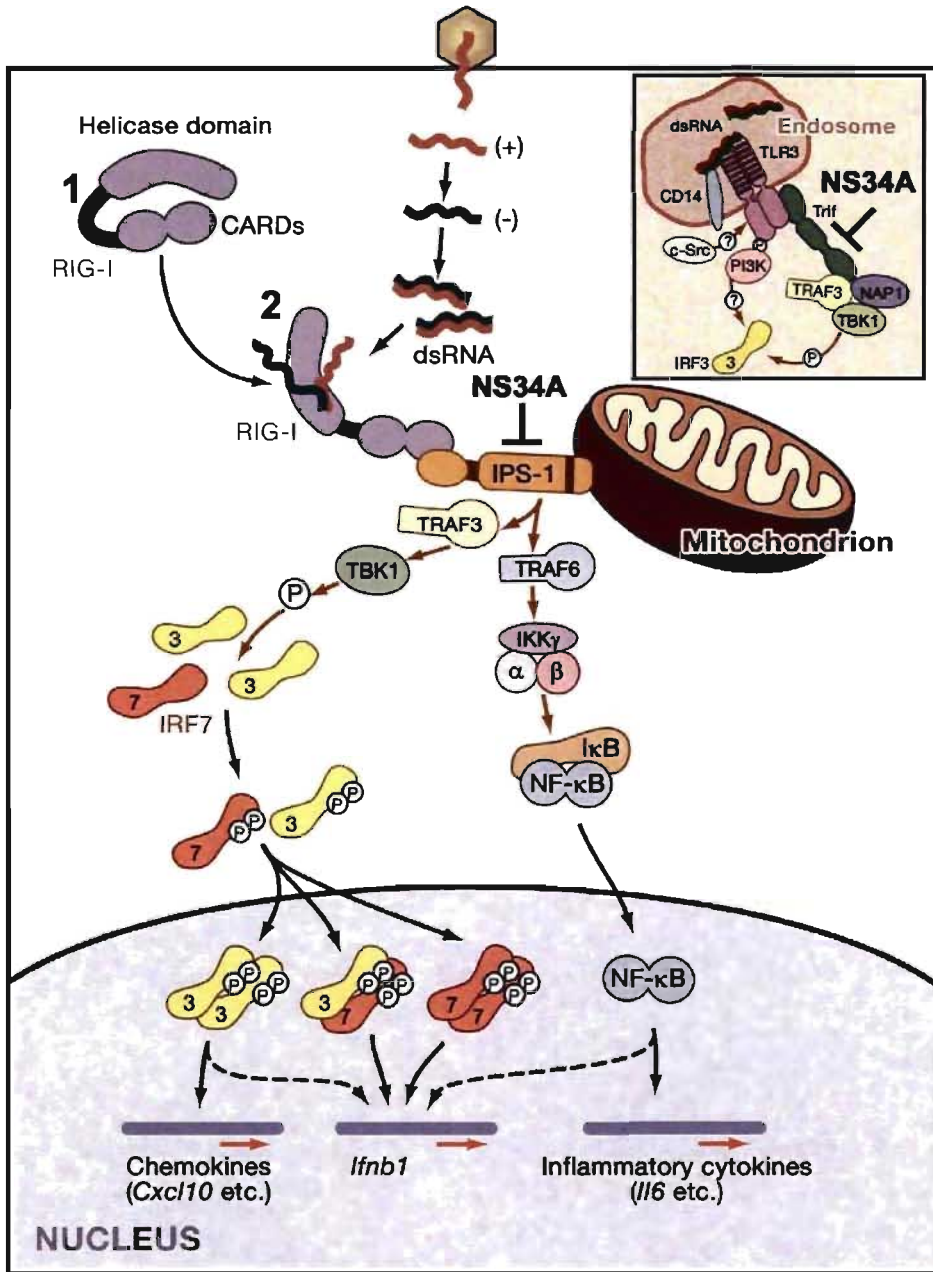
1.2.1 Au-delà de la fonction virologique des protéases: mécanisme d'interférence avec les voies de l'immunité innée antivirale

Les protéines non-structurales du VHC interagissent entre elles et avec certaines composantes de l'hôte afin d'assurer la réplication virale et la résistance du virus à l'immunité antivirale. Une étude suggère que le domaine protéasique de NS3 peut interférer avec la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) en interagissant avec la protéine LMP7 qui est une composante du protéasome, ce qui pourrait rendre ce virus indétectable à la surveillance par le système immunitaire (291). Par ailleurs, d'autres études récentes ont rapporté que la NS3 pouvait lier et séquestrer la protéine kinase TBK1 (442), ainsi que dégrader les adaptateurs signalétiques TRIF (347) et IPS-1 (283, 349, 354, 367, 403), inhibant de la sorte l'activation du facteur de transcription IRF3 (169). Cette activité protéolytique est très sensible au BILN 2061 (Cilepruvir) qui restaure complètement la fonction antivirale d'IRF3 dans des hépatocytes infectés avec le VHCcc après seulement 24 heures de traitement (263). IRF3 est un régulateur-clé de la production d'IFN de type I via la voie de signalisation médiée par l'hélicase cytoplasmique RIG-I (168, 660) et le TLR3 qui sont des récepteurs impliqués dans l'immunité innée en fixant l'ARN viral (le TLR3 est décrit en plus amples détails à la section 3.1). Cette liaison active le facteur IRF3 et, ultérieurement, toute la cascade

de signalisation induisant la production des interférons, incluant l'IFN- β qui est l'un des principaux agents antiviraux de l'immunité innée contre le VHC (Figure 4).

Les interférons circonscrivent et limitent la dissémination de l'infection au VHC en activant au sein de la cellule hôte la synthèse de protéines possédant des propriétés antivirales capables d'agir à différentes étapes du cycle de multiplication virale (533). Parmi celles-ci, les 2',5'-oligoadénylate synthétases (OAS) associées à l'endoribonucléase RNase L sont des composantes du système OAS-1b/RNase L qui, régulé par les interférons, provoque une dégradation des ARN, notamment viraux, et participe donc aux défenses antivirales innées. D'ailleurs, Han *et al.* (215) montrent que la RNase L intervient dans la résistance précoce de la cellule hôte au VHC; elle s'attaque en effet aux brins positifs, donc codants du virus. Par ailleurs, la sensibilité face à l'action de la RNase L dépend de la présence et du nombre de sites spécifiques de clivage reconnus par cette enzyme dans le génome du VHC et peut ainsi varier selon le génotype viral (216, 624). De plus, la RNase L aurait également un rôle d'amplificatrice de l'activation de RIG-I (378). Pedersen *et al.* (450) ont montré que l'IFN- β est capable de réguler spécifiquement à la baisse l'expression de miR-122, un micro-ARN très exprimé dans le foie qui facilite la réplication du VHC selon un mécanisme encore inconnu (267). Le génome du VHC contient des régions d'ARN bicaténaires, telles que les régions 5'UTR et 3'UTR qui peuvent déclencher l'induction de l'IFN- β dès leur introduction et réplication dans la cellule hôte (569); d'où la nécessité pour le virus d'inhiber ces voies afin de favoriser sa propagation (50, 178).

Figure 4. *Protéase NS3/4A: antagoniste des voies de l'immunité innée antivirale.* Adapté de Honda *et al.* (236). Au cours d'une infection virale, l'induction des interférons par les ARN bicaténaires (dsRNA) est déclenchée soit par interaction de ces acides nucléiques avec la partie extracytoplasmique du récepteur TLR3 (sous sa forme dimérique) dans les endosomes, soit à la suite de l'intrusion virale dans le cytoplasme, par interaction avec des ARN hélicases spécifiques, telles que RIG-I. Dans les deux cas, il y a activation des kinases $IKK\alpha\beta\gamma$ et TBK1/IKK ϵ , ce qui provoque l'activation et la migration vers le noyau des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3, respectivement, et l'induction de l'IFN- β (phase précoce); IRF7 sert lors de la phase tardive (non montré) (9). En ce qui concerne l'activation par la voie TLR3, il y a recrutement de l'adaptateur TRIF par la partie intracytoplasmique TIR du TLR3 (panneau inséré). Du point de vue de l'activation de la voie RIG-I (inactive en 1), la liaison du domaine ARN hélicase de RIG-I avec les dsRNA provoque un changement dans sa conformation (1 vers 2) qui permet à son domaine N-terminal CARD de s'associer avec son adaptateur récemment identifiée: IPS-1, localisé à la membrane mitochondriale. IPS-1 est responsable du recrutement des kinases et de l'activation en aval des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3. Le génome du VHC contient des régions dsRNA (5'UTR et 3'UTR) qui peuvent déclencher l'induction de l'IFN- β dès leur introduction dans la cellule hôte; cependant, le VHC par l'action de sa sérine protéase NS3/4A peut cliver à la fois l'adaptateur TRIF et l'adaptateur IPS-1 interférant ainsi avec la cascade.



2. PRINCIPAUX ACTEURS IMMUNITAIRES LORS DE L'INFECTION AU VIRUS DE L'HÉPATITE C

L'infection au VHC se caractérise dans la grande majorité des cas par une forme persistante qui mène progressivement chez environ 20% des porteurs virémiques à l'émergence de complications tels la fibrose et une insuffisance hépatique (129, 238). Étant donné que l'infection aiguë au VHC est médicalement non apparente dans la plupart des cas, les corrélats immunologiques susceptibles de déterminer le rétablissement n'ont été que très peu définis par la littérature récente. De fait, la comparaison détaillée des réponses humorales et cellulaires a été entravée par le fait que les cohortes de patients humains VHC-séropositifs sont habituellement hétérogènes et que les données cliniques concernant un suivi à long terme des paramètres immunitaires dès la phase aiguë de l'infection ne sont que rarement disponibles en raison de son diagnostic difficile; $\geq 80\%$ des cas aigus sont asymptomatiques (440). Néanmoins, on pense que la réponse immunitaire acquise à médiation cellulaire, qui fait appel entre autre aux lymphocytes cytotoxiques $CD8^+$ (CTL), contribue à l'élimination des cellules infectées et mène au contrôle de la virémie lors d'hépatite C aiguë (297, 321, 410, 445).

La persistance de l'hépatite C peut dépendre de nombreux facteurs, soit d'ordre viral (virémie élevée, hétérogénéité génétique de la population virale, apparition de mutants d'échappement (620), existence de réservoirs extrahépatiques), soit d'ordre génétique tels le récepteur KIR2DL3 sur les NK (289) et les allèles HLA-C des groupe 1 et 2 qui influencent directement la capacité de l'hôte à résoudre l'infection (156, 592). En outre, il existe une convergence d'arguments en faveur d'un rôle qualitatif des réponses immunitaires et il est vraisemblable que différents mécanismes s'intriquent pour aboutir à l'échec de l'immunité anti-VHC (149, 196, 251, 474, 547, 597, 637). La section 1.2.1 a fait état des récents mécanismes d'interférence décrits pour le VHC afin de contrer l'immunité innée qui s'opère dans une cellule infectée afin de neutraliser la dissémination du virus à d'autres foyers cellulaires (178). Dans la présente section, nous décrivons les déterminants de l'immunité adaptative liés à l'éradication des réservoirs et à la virémie circulante tout en illustrant en quoi cette composante du système immunitaire de l'hôte détient un rôle fondamental dans

l'histoire naturelle de la pathogénèse virale liée au VHC (142). La persistance semble en fait due à l'impuissance de cette réponse antivirale à médiation cellulaire (B et T) à endiguer la progression de la virémie et à éradiquer les réservoirs de cellules infectées. Plus particulièrement, nous ferons ressortir le fait que la réplication continue du VHC en présence de CTL CD8⁺ et d'anticorps spécifiques à des antigènes viraux, alors que la réponse CD4⁺ T_H1 (IL-2⁺IFN- γ ⁺) est indétectable, tend à démontrer que les CTL, seuls avec la réponse humorale, sont incapables d'enrayer l'infection dans la majorité des cas.

2.1 Réponse humorale et protection que confèrent les cellules B

Durant la phase aiguë de cette infection, une immunité humorale vis-à-vis du VHC est détectée par les tests immunoenzymatiques, mettant en évidence une production d'anticorps spécifiques dirigés à la fois contre les épitopes des protéines structurales et non structurales du virus (16, 281). De nombreux arguments plaident en faveur d'un effet neutralisant de certains anticorps au cours de l'infection virale (667). Des expériences de neutralisation ont été tentées chez le chimpanzé *Pan troglodytes* (seul modèle animal existant où l'infection suit une progression analogue à celle observée chez l'être humain) avec des sérums hyperimmuns de lapin obtenus par immunisation contre un peptide synthétique dérivé de la région hypervariable 1 (HVR1) de la protéine E2 à la recherche d'une capacité protectrice (158, 159, 302, 303). Les anticorps de patients atteints d'hépatite C aiguë ou chronique contiennent des anticorps capables d'inhiber la fixation des protéines d'enveloppe E2 du virus à des lignées cellulaires *in vitro* (286, 363), en particulier des lignées d'origine hépatocytaire. D'autres cibles des réponses anticorps existent sur le génome viral, mais le rôle de ces réponses dans la protection contre l'infection est mal connu et leur valeur protectrice reste discutable (247).

La production d'anticorps neutralisants permet à l'hôte infecté de contrôler et d'éliminer de nombreuses infections virales. Cependant, à ce jour aucune différence qualitative ou quantitative des réponses humorales n'a été impliquée dans la guérison ou la persistance du VHC après un épisode aiguë (318, 469, 566). Après la guérison, la réponse humorale dirigée contre les protéines d'enveloppes peut disparaître alors

qu'en revanche la réponse lymphocytaire T dirigée contre les protéines non-structurales demeure détectable chez l'être humain neuf fois sur dix (581). Cette réponse est fonctionnelle puisqu'elle permet de prévenir la réinfection expérimentale chez le primate (36). En effet, les travaux de Farci et ses collègues (157) ont démontré, chez des chimpanzés convalescents, l'inefficacité de la réponse humorale à protéger contre une recrudescence de la virémie suite à une réinfection avec des isolats VHC homologues (377, 497). À l'opposé, ces anticorps anti-VHC seraient impliqués dans les manifestations extrahépatiques de l'hépatite C chronique. Ainsi, celle-ci est fréquemment associée à une cryoglobulinémie de type II ou III (4, 320, 526). En résumé, la réponse humorale spécifique du VHC, bien qu'associée à un certain pouvoir neutralisant, n'est pas suffisante pour protéger contre une réinfection ou éviter la dissémination du virus au cours de l'infection aiguë; d'autant que l'infection se transmet de préférence de cellule-à-cellule évitant ainsi le milieu extracellulaire (596). Elle peut toutefois être abondante et aboutir à la formation de complexes immuns à l'origine des pathologies associées à une cryoglobulinémie de type II ou III.

2.2 Mémoire CD8⁺ requise pour une protection efficace contre une infection VHC persistante

La mémorisation immunitaire se définit par la capacité d'un hôte à garder une mémoire moléculaire de la réponse immunologique du système adaptatif par rapport à une agression antérieure donnée et à utiliser cette prédisposition afin de répondre plus rapidement à une agression récidiviste. De ce fait, une rencontre ultérieure avec le même antigène entraîne une réponse beaucoup plus rapide car la fréquence des précurseurs T est plus importante qu'au cours de la réponse primaire. Lors d'une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), cette fréquence passe ainsi de 1 à 2 x 10⁻⁵ cellules naïves (CD27⁺45RO⁻62L⁺CCR7⁺) (54) à 1/1000 ou 1/100 dans la population CD8⁺ mémoire (334, 417). Cette fréquence élevée persiste à long terme chez l'hôte (214); ainsi, 22 mois après une infection par le virus de Sendai, la fréquence en CD8⁺ spécifiques est égale à celle observée trois mois après l'infection (241).

La numération des tétramères VHC-spécifique pour un épitope donné (par exemple, NS3₁₃₅₉), bien que significativement augmentée chez la plupart des patients non-répondants, demeure à des fréquences modestes n'excédant pas au mieux 0.2% de la population CD8⁺ totale (556); c'est loin des 1-2% de CD8⁺ anti-NS3₁₀₇₃ spécifiques lors de la clairance de ce virus dans les cas d'infections aiguës résolutes (337). Cela conforte l'idée que l'hôte n'atteint pas, dans la majorité des patients chroniquement infectés avec le VHC, le seuil quantitatif de CTL VHC tétramère⁺ nécessaire pour induire une clairance virale efficace lors de la phase aiguë (553). Toutefois, la seule présence d'un grand nombre de cellules T activées capables de reconnaître spécifiquement les antigènes d'un virus (385) s'avère insuffisante pour entraîner un contrôle de l'infection. Les cellules T doivent être dans l'état idéal d'activation et de différenciation pour médier des effets antiviraux de longue durée. Ce point de vue est souvent mal apprécié; l'augmentation de fréquence doit s'accompagner de modifications qualitatives intrinsèques qui contribuent à la plus grande efficacité de la réponse mémoire (31, 83, 287, 451, 465). Étonnamment, les effecteurs CD8⁺ tardifs (très haute cytotoxicité antivirale) sont presque 100 fois moins efficaces pour induire une résolution d'une infection *in vivo* sur une base cellulaire comparativement aux cellules CD8⁺ mémoires moins différenciées (493, 494, 634).

Les cellules T mémoires moins différenciées (CD27⁺45RO⁺62L⁺CCR7⁺) ont un haut potentiel prolifératif *in vivo*, sont moins enclines à mourir par apoptose que les cellules plus différenciées (CD27⁻45RO⁻62L⁻CCR7⁻), et ont une plus haute capacité à répondre aux cytokines γ c homéostatiques parce qu'elles expriment des récepteurs tels que la chaîne α du récepteur de l'IL-7 (CD127) (523). L'expansion *in vivo* des lymphocytes dans le cadre d'infection persistante incite à la différenciation progressive des cellules CD8⁺ T vers un état d'effecteur très avancé (tardif), aboutissant à des changements phénotypiques et fonctionnels qui font de ces CD8⁺ des cellules moins aptes à profiter des éléments activants présents chez l'hôte pour générer une mémoire immunologique capable d'assurer le maintien d'une réponse antivirale efficace *in vivo* (293, 296, 510). Dans cette sous-section, il sera brièvement question des acquisitions récentes dans ce domaine, en insistant sur notre

compréhension actuelle de la différenciation de la mémoire en cas d'infection persistante et du rôle de cette mémoire CD8⁺ dans l'infection VHC.

2.2.1 Développement de la mémoire lors d'une infection virale

La séparation asymétrique des cellules filles dès la première division cellulaire pour les lymphocytes T a été observée par Chang *et al.* (87): une cellule fille adopte un sort mémoire et l'autre celui d'effecteur, suggérant que le lignage entièrement mémoire pourrait être fixé aussi tôt que la première division au sein de la population virus-spécifique activée. Lefrançois et Marzo (341) ont avancé l'idée qu'une minorité de cellules T activées quelques jours après l'insulte constituent des mémoires préformées (CD127^{hi}), c'est-à-dire qu'elles auraient sauté l'étape d'effecteur (298), possédant déjà tous les traits caractéristiques de la mémoire qui se forme après contraction et ce des semaines plus tard. Toutefois, les cellules CD127^{hi} ont une fonction effectrice complète, expriment les molécules cytotoxiques (par exemple, granzyme B et IFN- γ) et sont similaires à leurs homologues CD127^{lo} puisqu'elles ont une capacité proliférative relativement basse comparativement à la mémoire (244, 245, 272); elles ont, cependant, une capacité augmentée à devenir des cellules mémoires capables de s'auto-renouveler en comparaison aux CD127^{lo}. Plusieurs études subséquentes avec des modèles infectieux ont soutenu l'idée que la fraction des CD8⁺ effecteurs CD127^{hi} contiennent des cellules effectrices précurseurs à potentiel mémoire (MPEC) bien que dans quelque cas (par exemple, en faibles conditions inflammatoires), ce ne sont pas toutes les CD127^{hi} qui sont destinées à peupler le réservoir mémoire (76, 217, 572). En outre, le réservoir d'effecteurs est hétérogène et contient beaucoup de cellules effectrices de courte durée (SLEC, cellule terminalement différenciée) qui mourront après l'infection, et une plus petite fraction de MPEC.

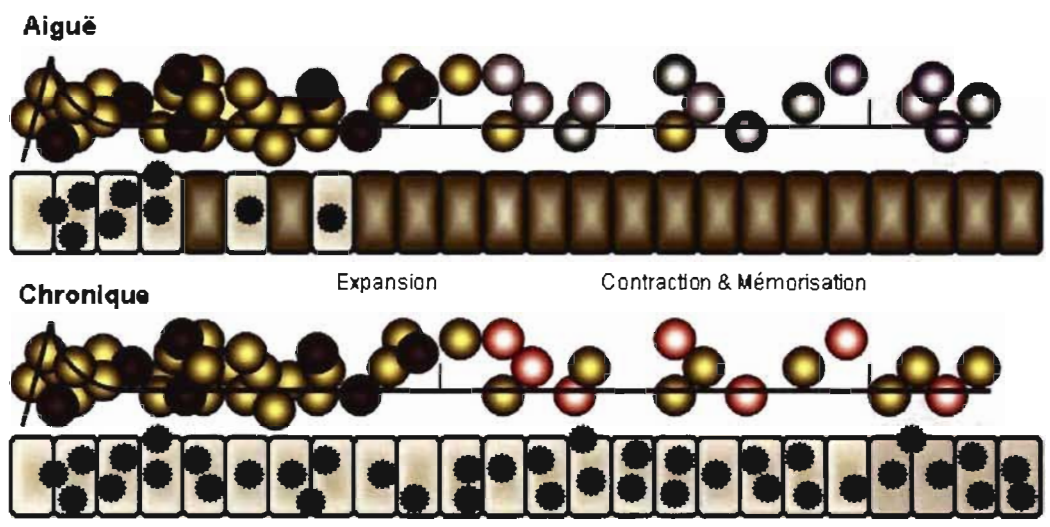
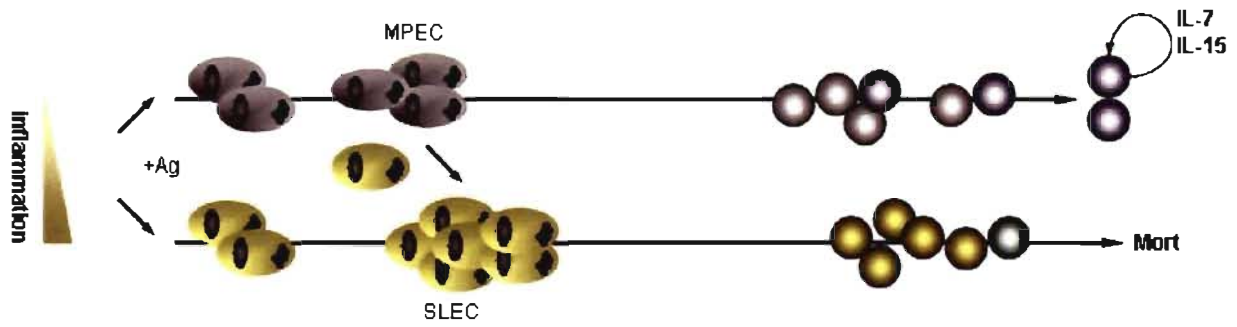
Le modèle de la différenciation progressive avec une composante instructive (sort cellulaire) (273) propose que les MPEC ne sont pas des cellules mémoires préformées comme suggéré par de précédents modèles (380), mais des cellules qui possèdent plutôt les caractéristiques des effecteurs CD8⁺ et qui exigent une différenciation additive pour développer les propriétés quintessentiels reconnues aux cellules

mémoire (potentiel prolifératif élevé et capacité de s'auto-renouveler). En fait, les MPEC maintiennent leur plasticité de telle sorte qu'elles peuvent se développer en SLEC si des signaux stimulateurs forts sont produits (c'est-à-dire en cas de persistance d'antigène et/ou d'inflammation). La base de la décision du sort cellulaire d'une CD8⁺ activée est donc l'importance de la force globale du signal qui inclut les effets combinés de l'antigène, des molécules costimulatoires et de l'inflammation (signaux 1, 2 et 3 respectivement). De forts signaux entraînent nécessairement une plus grande expansion clonale, mais favorisent également la différenciation en effecteurs terminalement différenciés (SLEC). Le potentiel mémoire des CD8⁺ est inversement relié à l'expression de T-bet qui s'avère être le facteur de transcription clé de la différenciation en effecteur CTL: les SLEC contiennent de plus hautes quantités de T-bet que les MPEC, et sa surexpression dans des effecteurs CD8⁺ MPEC induit un destin SLEC (269). L'expression de T-bet est régulée par des cytokines inflammatoires (IL-12) qui influencent négativement le rapport MPEC/SLEC (86, 248). Takemoto *et al.* (584) montrent clairement que l'IL-12 n'est pas simplement qu'un régulateur négatif de la formation de la mémoire Eomes-commandé (249), mais qu'elle module à la fois l'expansion et la contraction de l'explosion clonale: une diminution de l'expansion des CD8⁺ gp33-spécifiques lors d'une listériose ainsi que l'émergence d'un défaut dans la phase de contraction avec une plus haute proportion de cellules mémoires de qualité médiocre (éventuellement épuisées) ont été observées chez des souris IL-12^{-/-}.

En somme, selon la force et la qualité du signal de départ, soit un destin MPEC (CD127^{hi}KIRLG1^{lo}CD62L⁺) ou SLEC (CD127^{lo}KIRLG1^{hi} CD62L^{lo/-}) sera adopté tôt après l'activation (Figure 5). Les MPEC acquièrent les fonctions associées aux effecteurs, mais restent multipotentes (c'est-à-dire qu'elles ont le potentiel de devenir soit mémoire ou SLEC). Les MPEC survivent à la phase de contraction (où seulement 5-20% des cellules sont préservées (28)) et engendrent des cellules TEM transitionnelles qui progressivement se convertissent en cellules T mémoires centrales (TCM) durables. La plupart des SLEC meurent, mais quelques-unes persistent avec une durée de vie limitée en tant qu'étape cellule mémoire effectrice

(TEM) terminalement différenciée; cependant, ces SLEC mémoires ne se renouvellent pas automatiquement par elles-mêmes et ne subissent pas de conversion en TCM.

Figure 5. *Différenciation de la mémoire lors d'infections virales.* L'infection aiguë primaire produit SLEC (jaune pâle) et MPEC (gris), selon la force du signal inflammatoire; la majorité des SLEC meurent, mais quelques-unes persistent pour des intervalles finis en tant que TEM (vert). En contraste, les MPEC survivent et se différencient progressivement de cellules TEM transitoires (blanc) à TCM protectrice (bleu foncé). Les TCM se maintiennent indéfiniment en présence des cytokines homéostatiques appropriées (auto-renouvellement) et auraient la capacité de se différencier en TEM lors d'une restimulation antigénique. Lors d'infections chroniques, où les cellules T sont exposées continuellement à une stimulation prolongée (par exemple, LCMV, VIH, VHC), les CD8⁺ subiront une différenciation altérée par rapport au scénario précédemment décrit; devenant des TEM terminalement différenciées qui sont fonctionnellement épuisées (rouge). Seulement une sous-population de TEM dans l'infection chronique démontre une prolifération extensive qui maintient les nombres stables; au lieu de la prolifération homéostatique lente et régulière caractéristique de la mémoire, celle-ci est dépendante de la présence d'antigènes.



Les caractéristiques des populations mémoires CD8⁺

Tel qu'évoqué ci-haut, les populations mémoires sont hétérogènes tant en terme de phénotype que de fonction (récapitulé dans le tableau 1). La différenciation des CD8⁺ naïfs après reconnaissance de l'antigène chez l'être humain s'accompagne tout d'abord d'un changement d'isoforme de CD45RA vers CD45RO, suivi d'une perte séquentielle de l'expression de CCR7 et CD27 (21). Les TCM expriment CD45RO, CCR7 et CD27. Elles sont appelées TCM car elles peuvent répondre aux chémokines CCL19 et CCL21, leur permettant ainsi de migrer vers les ganglions lymphatiques (LN) (510). Il est possible de distinguer deux sous-populations de TEM selon l'expression ou non du couple CD27/CD45RO. Les cellules effectrices n'expriment plus CCR7, ni CD27, mais continuent d'exprimer CD45RO alors que les effecteurs dites en différenciation terminale réacquièrent CD45RA (SLEC), perdant ainsi l'isoforme RO (85). Elles expriment d'autres récepteurs aux chémokines et certaines molécules d'adhésion qui leur permettent de migrer vers les différents tissus périphériques non lymphoïdes. Les TEM auraient un rôle de réponse immédiate du fait de leurs capacités effectrices et de leur localisation périphérique, proche des sites d'entrée des agents pathogènes (les poumons, le foie ou la *lamina propria* intestinale) (25, 384, 386, 432). Au contraire, les TCM ont de faibles capacités effectrices immédiates mais une forte capacité proliférative à la fois homéostatique (auto-renouvellement) et antigène-induite. Ces caractéristiques, jointes au fait que les TEM ne persistent pas (383), permettent de proposer qu'elles forment l'origine de la mémoire à long terme capable de soutenir, après restimulation avec l'antigène, des réponses effectrices en générant les TEM (182, 245).

Des évidences s'accumulent qui montrent que les TCM corrélerent plus favorablement avec des réponses protectrices dirigées contre diverses infections chroniques (14, 436, 531, 613). En fait, les CD8⁺ virus-spécifiques qui sont engendrées par des infections chroniques demeurent, à des degrés divers, phénotypiquement CD62L^{lo}CCR7^{lo}, et ne se développent que rarement en TCM (545, 630). Ces CD8⁺ ont également une capacité proliférative réduite, expriment de faibles quantités de récepteurs pour l'IL-7 et l'IL-15, et sont incapables de répondre efficacement à ces cytokines

homéostatiques; le maintien à long terme des CD8⁺ virus-spécifiques lors d'une infection chronique dépend plutôt d'épisodes périodiques de division cellulaire en raison de la persistance de l'antigène (544, 631). En plus de ces altérations dans le programme de différenciation de la mémoire, les CD8⁺ virus-spécifiques en infection chronique deviennent épuisés et perdent leurs fonctions effectrices (632, 633) (récapitulées dans le tableau 2 pour le VHC).

Tableau 1. *Phénotype, propriétés et fonctions effectrices des populations mémoires.*

		Naïf	TCM	TEM	SLEC	
Phénotype	CD27	+	+	-	-	
	CD45RO	-	+	+	-	
	CD62L	+	+	-	lo	
	CD122 (IL-2/15Rβ)	+	++	+	-	
	CD127 (IL-7Rα)	-	+	+/-	-	
	CCR7	+	+	-	-	
Localisation	Organe lymphoïde secondaire	Oui	Oui	Non	Non	
	Périphérie	Non	Non	Oui	Oui	
Maintien	Prolifération antigène dépendante	+	++	+/-	-	
	Auto-renouvellement	-	+++	+	-	
	Persistance	+	+++	+	-	
Fonctions effectrices	Cytokine(s) produite(s)	IL-2	+	+	-	-
		IFN-γ	-	+	++	+++
		TNF-α	-	+	++	+++
	Cytotoxicité	-	+	+	++	

[†]Exceptionnellement retrouvé dans la rate.

Tableau 2. *Caractéristiques des CD8⁺ VHC-spécifiques épuisés.*

		Référence(s)
Phénotype	CD27	+/- (21)
	CD127	-/lo (191, 479)
	CCR7	+
	PD-1	hi (192, 610, 611)
	KLRG1	lo (41)
Fonction(s)	Potentiel prolifératif	faible (430, 612, 625)
	Auto-renouvellement	faible
	IL-2	- (609)
	IFN-γ	-/lo (560)
	cytotoxicité	faible (454)

2.2.2 Réponse lymphocytaire CD8⁺ cytotoxique anti-VHC

Une réponse lymphocytaire T CD8⁺ cytotoxique VHC-spécifique restreinte par le CMH-I est présente dans le foie et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) des patients atteints d'hépatite C (647). La résolution de l'infection primaire au VHC est temporellement associée avec une réponse CTL diverse et durable,

laquelle contribue chez le chimpanzé, et probablement chez l'être humain, à la résolution rapide des réinfections (396, 548, 627, 628). Il est clairement montré qu'au cours de l'hépatite C aiguë, le nombre de clones lymphocytaires T CD8⁺ spécifiques au VHC produisant de l'IFN- γ présent dans le sang périphérique est corrélé avec l'éradication du VHC six mois après le début de l'infection (206). Au cours de l'hépatite chronique, les CTL spécifiques du VHC sont également détectables dans l'infiltrat cellulaire hépatique où ils sont pour certains chercheurs plus abondants que dans le sang périphérique (307). Des études quantitatives de la réponse T antigène-spécifique fondées sur des mesures de fluorescence des interactions tétramériques HLA/peptides du VHC réalisées au cours de l'infection chronique ont montré que la réponse CTL spécifique, bien que régulièrement détectée au niveau du foie (222), était souvent plus faible en intensité (33) que la réactivité mémoire vis-à-vis d'autres virus comme ceux de l'influenza A, du cytomégalo virus ou du virus d'Epstein-Barr (486, 487).

Une corrélation inverse entre l'intensité de la réponse cytotoxique et la charge virale a été montrée (488), suggérant que la réplication du VHC est contrôlable par les CTL (153), mais que ce contrôle n'est le plus souvent que partiel dans la majorité des cas (228, 336, 424). Il a donc été avancé que la diversité épitopique de la réponse CTL spécifique du VHC est plus grande chez les patients ayant une hépatite aiguë virale C guérissant spontanément que chez ceux développant une hépatite chronique (88, 106, 556). Lechner *et al.* (338) confirment que la réponse CD8⁺ est forte chez les personnes qui guérissent alors qu'elle est très faible, voire indétectable, chez les patients chroniquement infectés. L'action des CTL sur l'élimination de la virémie pourrait être le résultat de la lyse des cellules infectées par l'axe granzyme-perforine (221) et/ou l'action de certaines cytokines, telles que l'IFN- γ (172, 323, 590), capables d'inhiber la réplication intracellulaire des virus hépatotropiques (210).

Thimme *et al.* (591) ont publié des résultats qui suggèrent que la réplication du VHC est contrôlée de façon précoce par des CD8⁺ agissant par un mécanisme non-cytolytique. Ainsi, un sujet étudié au moment très précoce de son infection et qui élimina la virémie a présenté un épisode d'hépatite aiguë prolongé coïncidant avec

l'apparition de lymphocytes $CD8^+CD38^+$ $IFN-\gamma^-$ anti-VHC et une diminution légère de la charge virale. À la suite de l'apparition d'une forte réponse $CD4^+$, ces lymphocytes $CD8^+$ ont perdu le marqueur $CD38$ et acquis la capacité de produire de l' $IFN-\gamma$ en réponse au VHC. L'émergence de $CD8^+CD38^-$ $IFN-\gamma^+$ est associée avec une diminution rapide de la virémie circulante ($5 \log_{10}$) sans reprise de la maladie hépatique. Pour les autres patients à l'étude, l'infection est devenue chronique chez les sujets qui ne développèrent aucune réponse cellulaire T et chez ceux pour qui la réponse $CD4^+$, initialement forte, a disparu.

L'ensemble de ces travaux montre que la rapidité de réplication permet probablement au VHC de devancer la réponse CTL et de persister. Une haute charge virale VHC pourrait mener à l'épuisement des cellules T virus-spécifiques (179, 443). Le début de l'hépatite coïncide avec le début de la réponse CTL. Néanmoins, l'élimination du virus pourrait être médiée par une population de $CD8^+$ contrôlant la réplication du VHC par des mécanismes cytolytiques et non-cytolytiques (335), mais dont la fonction dépend d'une réponse $CD4^+$ efficace (609). Puisque le VHC infecte principalement les hépatocytes, les $CD8^+$ VHC-spécifiques ne seraient qu'insuffisamment générés en premier lieu, peut-être en raison d'une activation déficiente au niveau des cellules T naïves (44, 45, 353) ou d'une aide $CD4^+$ insuffisante une fois les cellules T VHC-spécifiques naïves activées (61, 314, 635). En effet, les travaux de Wedemeyer *et al.* (625) ont permis de constater que les $CD8^+$ spécifiques du VHC, bien que présents chez les cas virémiques, ne proliféraient guère à la suite de la reconnaissance de leurs déterminants antigéniques par le TCR, contrairement à la cohorte avirémique sous étude. Ces auteurs ont corrélé ces anomalies (207, 337, 612) avec la diminution de la réponse $IFN-\gamma^+$ *ex vivo* des $CD4^+$ en Elispot, sans pour autant qu'il s'agisse d'une permutation classique d'une réponse T_H1 vers T_H2 puisque la sécrétion d'IL-5 n'était pas plus élevée. En conclusion, les preuves d'une immunité CTL spécifique antivirale sont nombreuses tant au niveau périphérique qu'au niveau hépatique. Toutefois, la persistance virale malgré la présence de cette réponse CTL pourrait s'expliquer par un déficit fonctionnel de cette réponse en lien avec une limitation de la reconnaissance antigénique du virus par les

lymphocytes CD4⁺ (98, 118, 185, 260, 672) qui mène ces CD8⁺ à l'épuisement fonctionnel, tel que décrit à la section suivante.

La voie de rétrocontrôle PD-1/PD-L1: mécanisme du maintien de la chronicité

Des cellules effectrices fonctionnelles sont bien initialement produites dans la phase aiguë de l'infection au VHC, mais généralement leurs activités lytiques et prolifératives se dégradent progressivement (épuisement fonctionnel). De récents travaux sur diverses infections chroniques ont pu noter une augmentation très forte de la quantité en surface du récepteur Programmed Death 1 (PD-1/*Pdcd1*; CD279) chez les CD8⁺ virus-spécifiques "épuisés" et sénescents (537). Tel qu'il fut montré pour l'infection chronique par la souche 13 du LCMV chez la souris (32, 68, 415), Urbani *et al.* (610) ont noté que cette indolence apparaissant après la phase aiguë d'une infection persistante au VHC est corrélée avec une surexpression du récepteur PD-1 à la surface des CD8⁺ mémoires VHC-spécifique épuisés, alors que ce récepteur disparaît dans les cas d'infections aiguës résolutive (Smyk-Pearson 2007). PD-1 (CD279), glycoprotéine transmembranaire de type I de 50-55 kDa, est composé d'un seul domaine extracellulaire IgV qui partage 21 à 33% d'identité avec les molécules costimulatoires CTLA-4, CD28 et ICOS (669). PD-1 est un récepteur immunoinhibiteur exprimé par les cellules T et B activées. Des résidus tyrosines localisés au sein de son motif ITSM (446) une fois phosphorylés recrutent la tyrosine phosphatase SHP-2 (435) (et à un moindre niveau SHP-1 (89)) qui déphosphoryle les molécules effectrices activés par le TCR telles ZAP70 et CD3 ζ dans les cellules T (540) (Figure 6). L'association du récepteur avec son ligand (288, 333) entraîne l'inhibition de la prolifération des lymphocytes porteurs (23, 532), de leur production de cytokines (70) et, dans une certaine mesure, de la costimulation par CD28 (170, 495). PD-L1 (CD274), le ligand, est une glycoprotéine transmembranaire de type I composée de domaines extracellulaires IgC et IgV partageant 20% d'identité avec CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) (90, 136); tels les autres membres de la famille costimulatoire B7, PD-L1 est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (par exemple, les DC et monocytes) après activation (204, 654). Barber *et al.* (32) montrent dans le modèle LCMV 13 que l'utilisation d'un anticorps neutralisant

l'interaction entre PD-1 et son ligand ranime l'activité des CD8⁺ virus-spécifique épuisés, qui récupèrent leurs fonctionnalités aussi bien en détruisant les cellules infectées qu'en produisant des cytokines (IFN- γ , IL-2); ce phénomène observé est valable pour d'autres systèmes viraux chroniques, dont le SIV (457, 618), le VIH (116, 171, 456, 598, 666), le VHB (57, 453) et le VHC (192, 454, 479).

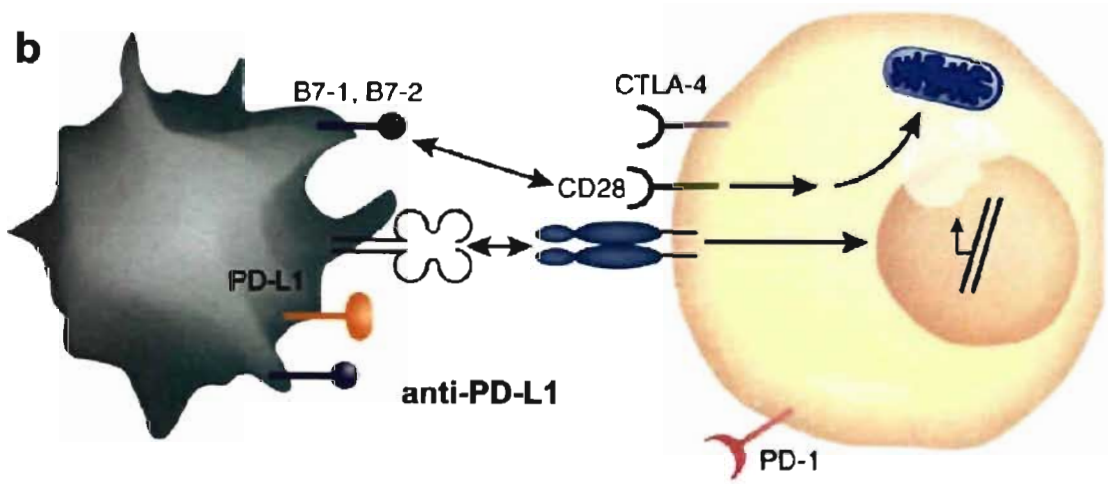
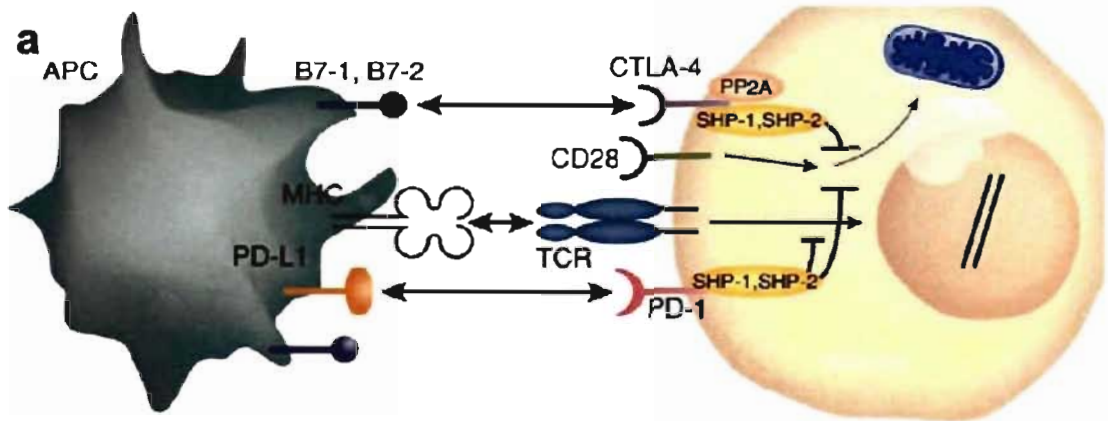
Williams *et al.* (642) signalent qu'il faudra se méfier des effets secondaires d'une telle approche thérapeutique puisqu'ils ont constaté que des souris *Pd1*^{-/-} lors d'une infection LCMV (souche Armstrong) meurent à la suite d'une hyper-réaction lymphocytaire. En fait, l'insuffisance PD-1 (*Pdcd1*^{-/-}) abroge chez la souris l'immunos tolérance périphérique, entraînant de multiples symptômes auto-immunitaires sans pour autant compromettre les mécanismes gouvernant la tolérance centrale (428). Zhong *et al.* (671) ont observés que l'induction de PD-1 sur la surface des cellules B spléniques après stimulation du BCR par un anti-IgM est supprimée en présence des signaux de danger tels que le LPS ou le CpG1826. Ces auteurs ont proposé une hypothèse du danger (389) modifiée quant à la façon dont PD-1 supprime sélectivement les immuno-réactions anormales: les pathogènes nocifs sont habituellement accompagnés de signaux de danger de sorte qu'ils empêchent l'induction de la tolérance PD-1-dépendante alors que les antigènes du soi ne sont pas associés à de telles signatures, autorisant ainsi l'induction prolongée de PD-1 et la tolérance du lymphocyte réactif vis-à-vis son antigène.

L'équipe de Probst (471) a examiné le rôle *in vivo* de PD-1 dans l'induction de la tolérance périphérique en ayant recours à des souris Rag^{-/-} chez lesquelles deux épitopes immunodominants des protéines GP₍₃₃₋₄₁₎ et NP₍₃₉₆₋₄₀₄₎ du LCMV ne peuvent être exprimés et présentés que par les CMH-I des DC CD11c⁺ après traitement au tamoxifen (système inductible DIETER (470)). Après transfert adoptif et reconstitution d'une chimère CD8⁺ LCMV-spécifique thy1.1-*Pdcd1*^{+/+} et thy1.2-*Pdcd1*^{-/-} (communiquant la spécificité anti-LCMV au répertoire naïf des souris DIETER), le traitement au tamoxifen avant challenge infectieux (contexte d'absence de danger) n'induit la tolérance que chez les CD8thy1.1⁺ qui seules expriment fonctionnellement PD-1; les CD8thy1.2⁺, insensibles à cette tolérance puisqu'elles

n'expriment pas PD-1, sont seules capables de protéger les chimères suite à un challenge LCMV (souche aiguë Armstrong). Si toutefois le traitement au tamoxifen est administré au même moment que le challenge LCMV (contexte de danger), cette immunotolérance est alors incapable de s'installer, permettant à la population Thy1.1^+ de conférer une certaine protection. De plus, comme précédemment mentionné pour les infections chroniques, cet état d'immunotolérance est réversible: en présence d'anti-PD-1 neutralisant, les DC inactives (absence de danger) n'inhibent plus les fonctions effectrices des CD8^+ $\text{GP}_{(33-41)}$ et $\text{NP}_{(396-404)}$ -spécifiques. Il est important d'ajouter que des CD8^+ de spécificités différentes (par exemple, $\text{GP}_{(276-286)}$) et/ou des cellules de même spécificité mais qui n'auraient pas été stimulées par des DC inactives, sont réfractaires à l'initialisation de cette tolérance. Deux études complémentaires ont récemment confirmé ces observations (132, 190). Ces auteurs, preuves à l'appui, suggèrent donc que les lymphocytes CD8^+ naïfs qui n'ont pas l'occasion de rencontrer leur antigène sur des DC activées poursuivent un programme de différenciation qui les conduit à une immunotolérance récessive, PD-1/PD-L1-dépendante et spécifique de l'antigène (1).

En somme, lors d'une infection chronique, on assiste, et ce en étroite relation avec la surexpression de PD-1 (499), à divers degrés de dégradations fonctionnelles des CD8^+ virus-spécifiques, à la fois au niveau de leurs fonctions cytotoxiques et de la production de cytokines antivirales. Il est important de noter que tous ces virus infectent et désactivent à des degrés divers les DC (434) (voir la section 4 en ce qui à trait au VHC).

Figure 6. *Régulation des signaux issus du TCR et de la costimulation CD28-dépendent par les récepteurs immunoinhibiteurs PD-1 et CTLA-4.* Modifié de Crawford et al. (102). (A) PD-1 et CTLA-4 (282), surexprimé sur les lymphocytes T et CD4⁺ respectivement dans le contexte d'infections chroniques, recrutent les tyrosines phosphatases SHP-1/2 et bloquent la phosphorylation d'AKT par CD28, affectant ainsi la production d'IL-2 (74) et le métabolisme du glucose (446). (B) Neutraliser PD-L1 (et CTLA-4) a pour conséquence d'augmenter les signaux activateurs issus du TCR et de la costimulation CD28-dépendent, renversant l'épuisement des lymphocytes effecteurs.



2.3 Persistance de la virémie et évasion en l'absence d'une mémoire CD4⁺ auxiliaire

Bien que nous venons d'illustrer que des corrélations temporelles et fonctionnelles existent entre une activité CTL et le contrôle initial de l'infection, la virémie persistante et la présence de CTL VHC-spécifique dans l'infiltrat intrahépatique et en périphérie, tout au long de l'évolution chronique de cette infection (152), tendent à démontrer que les CTL seuls sont incapables d'enrayer la virémie. La réponse CD8⁺ qui perdure indéfiniment chez le modèle chimpanzé à l'état chronique s'avère en être une preuve supplémentaire. En effet, le maintien d'une réponse CD8⁺ efficace (c'est-à-dire non-épuisée) dépend de la présence de CD4⁺ spécifiquement dirigés contre des antigènes du virus dans plusieurs modèles d'infection (276, 277, 387, 552, 573, 663). Par exemple, la présentation systémique des antigènes du LCMV en absence d'une aide CD4⁺ spécifique (414) mène à la tolérance des CD8⁺ LCMV-spécifiques, tandis que ces mêmes cellules sont activées en présence de CD4⁺. D'ailleurs, la déplétion expérimentale, chez le chimpanzé, du répertoire CD4⁺ conduit à la persistance de l'infection VHC, malgré l'existence d'une mémoire effectrice CD8⁺ établie (199). Le défaut de la réponse CD4⁺ constituerait à lui seul un élément permettant de rendre compte de la chronicité de l'infection (538, 570), et ce de façon indépendante de la sélection de mutants d'échappement à la pression immunitaire (588, 608). Dans cette section, il sera donc question des mécanismes par lesquels les CD4⁺ sont indispensables à la génération d'une mémoire CTL anti-VHC efficace.

2.3.1 *Le rôle des CD4⁺ dans l'obtention d'une mémoire CD8⁺ fonctionnelle*

Le rôle des CD4⁺ dans la génération de la mémoire CD8⁺ fonctionnelle a été récemment rapporté par un certain nombre de groupes (176). Même dans les modèles expérimentaux où l'importance et les fonctions effectrices de la réponse primaire CD8⁺ au jour 6-8 semblent être indépendants de l'aide des CD4⁺, les cellules mémoires qui se développent sont médiocres (260, 538, 539, 570, 573). Le système immunitaire est incapable de programmer la différenciation complète des CD8⁺ en l'absence de CD4⁺ antigène-spécifique. Des expériences antérieures avaient montré que pour que l'aide CD4⁺ soit efficace, le précurseur CTL devait avoir vu l'antigène

sur la même DC qu'identifiée par une cellule CD4⁺ (hypothèse du ménage à trois) (42); l'aide CD4⁺ autorise les DC à induire une réponses CTL (10, 52, 174). Ridge *et al.* (491) montrent en effet que la pré-activation de DC à l'aide d'anti-CD40 permet de remplacer l'aide CD4⁺; en l'absence d'effecteurs CD4⁺, les DC induisent une tolérance des CD8⁺ à l'antigène. Un rapport récent prouve que les interactions entre CD4⁺ et DC créent un gradient de chémokines (CCL3 et CCL4) qui attire les CD8⁺CCR5⁺ naïfs aux emplacements où ils peuvent recevoir la panoplie complète des signaux exigés pour leur différenciation en cellule mémoire (47, 76, 77). L'inhibition de l'activité CCL3/CCL4 par neutralisation ou la déficience en CCR5 lors de la phase primaire d'activation des CD8⁺ crée un défaut de réponse secondaire similaire à celui observé en l'absence de CD4⁺. Toutefois, dans le cadre d'une infection virale, une réponse CTL primaire se développe chez des souris *Cmh-II*^{-/-} (73) ou *Cd40*^{-/-} (571). Cette réponse primaire CD8⁺ en l'absence d'effecteurs CD4⁺ est due à l'activation directe des DC par les agents infectieux via leurs PRR ((226, 513, 623), voir section 3.1.1). Dans ce contexte particulier, l'activation directe des DC par l'antigène mime donc l'activation induite par les CD4⁺ (585), du moins en ce qui a trait à la différenciation des CD8⁺ en effecteurs CTL. Les CD4⁺ restent, néanmoins, requises pour l'étape de différenciation d'effecteurs MPEC IL6Rα⁺CD127⁺ à mémoire TCM.

Les signaux émanant de l'interaction entre une DC (CD40) et un lymphocyte CD4⁺ (CD40L) (224), couplés à la présence d'IL-2, aident à maximiser l'expansion effectrice des CD8⁺ contre des antigènes non-réplicatifs, la transition efficace d'effecteurs MPEC à TCM, et le maintien de la mémoire à long terme après l'infection virale aiguë (641). De façon intéressante, l'IL-2 (facteur de survie produit ici par les CD4⁺) agit tôt dans l'infection afin de conférer une capacité robuste de rappel aux cellules mémoires CD8⁺ qui se développent plus tard (643). De fait, l'apport exogène d'IL-2, en absence de CD4⁺, induit le maintien de CD8⁺ mémoires fonctionnels dans l'infection VIH (305, 352). Le résultat d'une aide CD4⁺ défectueuse est la génération d'une population CTL qui ressemble en grande partie à des cellules TEM qui, sans pour autant développer un potentiel cytotoxique élevé, ont

de faibles réponses secondaires à l'antigène, un faible potentiel sécrétoire de cytokines (IL-2, IFN- γ et TNF- α) (290) et qui expriment à la surface, après restimulation, le ligand pro-apoptotique TRAIL (259). Parce qu'ils expriment également le récepteur pour ce signal apoptotique, ils provoquent leur propre perte en commettant l'AICD (213); toutefois, même en l'absence de TRAIL, la mémoire CD8⁺ se détériore avec le temps en l'absence de CD4⁺ (27).

En somme, les lymphocytes CD4⁺ jouent un rôle essentiel en favorisant l'expansion initiale des CD8⁺ lorsque l'antigène vient d'une source immunogène relativement non-inflammatoire; peut-être en permettant aux CTL de produire de l'IL-2 de façon autonome (431). L'aide CD4⁺ rend la réponse CD8⁺ initiale plus grande et programme la différenciation des CD8⁺ répondants en cellule mémoire protectrice de longue durée (48); l'aide est également exigée longtemps après que l'antigène ait été éliminé afin de maintenir la mémoire CTL. Finalement, ils pilotent, en étroite coopération avec les DC, la différenciation des cellules CD8⁺.

2.3.2 La réponse lymphocytaire CD4⁺ anti-VHC

Chez le chimpanzé, la réponse précoce VHC-spécifique CD4⁺ intrahépatique est fortement corrélée avec l'éradication virale. L'étude de Sugimoto *et al.* (568) illustre ces faits cliniques chez l'être humain puisqu'elle établit clairement que, chez les porteurs chroniques, la réponse CD4⁺ en terme de fréquence VHC-spécifique IFN- γ ⁺ x10⁻⁶ PBMC est de dix fois inférieure à celle observée chez les cas ayant évolué vers la guérison. De plus, une réponse CD4⁺ de faible envergure (en terme de nombre et de la diversité des épitopes reconnus) a été mise en évidence chez les sujets ayant développé une infection chronique alors qu'elle est forte, multi-spécifique et durable chez ceux qui éliminent le virus (163, 184, 233, 674). Le rôle important des CD4⁺ a, en outre, été validé par l'observation d'une corrélation significative entre l'éradication spontanée de la virémie et l'expression d'allèles spécifiques du CMH-II (HLA-DRB1*1101 et/ou DQ1*0301) (15, 100, 219, 315, 379, 409, 594). D'autres études ont confirmé qu'une restriction de la réactivité des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du VHC s'associait plus volontiers avec l'état virémique (59, 133, 134,

503, 529, 530). Ainsi il a été observé qu'il y avait recrudescence de la virémie malgré un contrôle transitoire chez les cas cliniques montrant, dès la phase aiguë, une perte de la réponse proliférative VHC-spécifique CD4⁺ (184, 591). Chez les malades transplantés pour cause d'une cirrhose post-hépatite C (401), il a été démontré que la récurrence virale s'accompagnait généralement d'une prolifération lymphocytaire CD4⁺ spécifique du VHC modérée chez les malades avec récurrence histologique minimale, mais indétectable chez ceux avec récurrence sévère (629). Ces résultats suggèrent que l'incapacité à induire une réponse CD4⁺ VHC-spécifique contribue à la récurrence des lésions tissulaires d'origine virale sur le greffon hépatique après transplantation. En suivant de façon prospective 31 patients en phase aiguë, il a été possible à Smyk-Pearson *et al.* (2007) de préciser que la production d'IL-2 par les CD4⁺ VHC-spécifiques dès les premiers jours après l'infection est l'élément critique qui déterminerait le pronostic résolutif de celle-ci (26). L'élimination de la virémie paraît donc d'autant plus probable que se développe une réponse CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺ précoce, polyspécifique et durable, avec comme suite l'activation optimale des CTL contre de multiples motifs antigéniques conservés au sein du virus (101, 117, 188, 522). Conséquemment, lors de la phase aiguë, la progression vers la forme chronique pourrait être expliquée, du moins en partie, par une réponse CD4⁺ spécifique insuffisante (147, 554), notamment en terme de diversité des épitopes antigéniques reconnus sur la polyprotéine du VHC (187), et associée à une sécrétion réduite de cytokines de type 1 nécessaires au développement de la voie à médiation cellulaire.

Chez des individus évoluant vers la chronicité, Ulsenheimer *et al.* (605) rapportent la détection, dès les premières semaines de l'infection, de cellules CD4⁺ VHC-spécifiques présentant une fonction altérée qui se manifeste par une diminution abrupte de la réponse proliférative CD4⁺ VHC-spécifique, suivie d'un déclin rapide de la sécrétion d'IFN- γ . Ceci correspond pour ces auteurs à l'épuisement par anergie de l'immunoréactivité CD4⁺ spécifique (504). Il n'est pas impensable que cet état acquis *in vivo* soit en partie directement lié à la qualité des signaux activateurs transmis par les DC puisqu'elles sont les seules cellules attirées à la présentation antigénique en mesure d'activer une réponse primaire à partir des cellules T naïves

(254, 255, 261) et de conduire à l'établissement d'une mémoire immunologique compétente (202, 326-328). En effet, il a été récemment montré qu'en dépit d'un phénotype costimulateur normal et d'une capacité phagocytaire intacte, la capacité des DC à activer les CD4⁺ allogéniques était profondément altérée chez des patients chroniquement infectés avec le VHC contrairement aux sujets sains (444). Ce déficit fonctionnel entraînerait une réduction de sécrétion d'IL-2 indispensable à une activation fonctionnelle optimale des CTL. Il a été question précédemment que l'aide que confèrent les CD4⁺ à la mémorisation des CD8⁺ est obtenue en partie par l'intermédiaire de l'activation des DC (se référer à la section 2.3.1). Par conséquent, l'incapacité de l'hôte à monter une réponse immunoréactive CD4⁺ T_{H1} efficace contre les antigènes du VHC en raison d'une interférence virale avec les fonctions des cellules immunitaires spécialisées dans la présentation d'antigènes, c'est-à-dire les DC, pourrait expliquer l'incapacité des sujets séropositifs à supprimer leur infection virale. Ainsi, il s'avère pertinent de se demander s'il y a une dysfonctionnalité du rôle immunogénique des DC dans le cadre de l'infection VHC qui compromettrait la qualité des cellules T qui répondent aux antigènes viraux.

3. Les cellules dendritiques: intermédiaires de l'immunité innée/acquise

Le système adaptatif intervient, en général, plusieurs jours après l'infection, mais ses composants sont spécifiques et ont une forte affinité pour l'antigène. L'apparition d'un système capable de produire des récepteurs spécifiques très divers, fabriqués au hasard des réarrangements somatiques et distribués de façon clonale à la surface des lymphocytes, procure aux vertébrés un système de défense adaptable, capable de les protéger pendant une longue période. Grâce à ce répertoire, l'hôte est capable de réagir contre pratiquement n'importe quelle structure antigénique portée par des agents pathogènes. Cependant, ce système très élaboré est incapable de faire la différence entre un antigène d'origine viral, un antigène inoffensif et des constituants du soi. Comment le système immunitaire fait-il la différence entre les antigènes contre lesquels il doit réagir, et ceux qu'il doit tolérer, alors que les TCR spécifiques pour l'antigène ne font pas eux mêmes cette distinction? C'est le système immunitaire inné qui joue ici le rôle essentiel dans l'induction d'une réponse contre

les pathogènes et considérant que l'une de ses fonctions principales est de faire la distinction entre soi et non soi.

L'immunité innée est une réponse immédiate qui survient chez tout individu en l'absence d'une mémoire immunologique à une exposition préalable; elle constitue la première barrière de défense vis-à-vis des divers agents pathogènes qui attaquent l'être humain en assurant un rôle de sentinelle face à leur apparition dans la périphérie tissulaire. Ce système fait appel à des mécanismes de défense qui sont activés en quelques secondes ou minutes. Parmi ceux-ci, citons la phagocytose de bactéries par les polynucléaires neutrophiles ou les macrophages, la libération d'enzymes hydrolytiques, de peptides antimicrobiens, d'intermédiaires oxydatifs par les phagocytes, l'activation du complément par la voie alterne ou par la protéine qui fixe le mannose, la cytotoxicité naturelle des cellules NK contre les cellules infectées (124, 161). D'autres activités antimicrobiennes telles que la production d'oxyde d'azote nécessitent l'induction d'une synthèse protéique et n'agissent que dans un second temps. Cette immunité est en grande partie assurée par des cellules phagocytaires (monocytes, DC) et les lymphocytes NK qui sont dépourvus de récepteurs spécifiques de l'antigène. En revanche, ces cellules expriment des Pathogen Recognition Receptors (PRR) qui reconnaissent spécifiquement un nombre restreint de structures moléculaires propres aux micro-organismes (absentes des cellules de l'hôte), communes à de nombreux agents pathogènes (les signaux d'alerte dénommés PAMP) (463): des peptidoglycanes et des lipoprotéines bactériennes dans le cas de TLR2, la flagelline dans le cas de TLR5, et les motifs double brin 5'-triphosphate (239, 464), caractéristiques de l'ARN génomique viral dans le cas de l'hélicase cytosolique RIG-I pour ne nommer que ceux-ci. Les PRR peuvent également être activés par des ligands endogènes physiologiques libérés par des cellules de l'hôte qui subissent des dommages irréversibles (nécrose), notamment en cas d'inflammation, contrairement à la situation vécue lors d'une mort cellulaire programmée par apoptose (20). La stratégie des sentinelles de l'immunité innée n'est donc pas de reconnaître toutes la gamme des millions de motifs antigéniques existants, mais un petit nombre d'entre eux, sous la forme de structures répétitives hautement conservées et portées par les différents agents pathogènes.

On distingue généralement l'immunité innée de celle dite adaptative, bien que la défense de l'hôte vis-à-vis d'agents d'agression extérieure résulte d'une action concertée entre ces deux axes (231). À l'évidence, des données de plus en plus nombreuses s'accumulent qui montrent que cette distinction entre immunité innée et immunité adaptative ne correspond pas à la réalité. Il existe en effet des ponts majeurs entre ces deux réponses immunes dont on commence seulement à comprendre l'importance aussi bien dans la physiologie du système immunitaire que dans la physiopathologie des infections virales (507). Dans le cas des lymphocytes T, qui ne peuvent détecter l'antigène que lorsque sous forme de peptides associés aux molécules du CMH de classe I ou de classe II exprimées à la surface de cellules présentatrices d'antigènes, l'étape de reconnaissance implique donc les DC. La section suivante se propose d'illustrer que la DC se trouve de par sa fonction de présentatrice de l'antigène en fait à l'intersection des deux types d'immunité, car elle exprime les TLR (composante innée) dont l'activation via certains signaux de danger va initier et orienter la réponse adaptative. Cette section fera aussi état des données concernant la notion que les DC sont également un réservoir permissif à l'entrée et la réplication du VHC.

3.1 Structure/fonction des TLR

Janeway a rapporté en 1997 (395) l'identification du premier homologue humain du gène *Toll* antimicrobien de la drosophile, qui sera par la suite appelé TLR4. Dix autres membres de la famille des TLR sont aujourd'hui caractérisés (583). Parmi ceux-ci, on distingue les récepteurs qui transmettent les signaux de détection depuis le compartiment extracellulaire (TLR4) ou endosomal (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9). Les TLR sont des PRR transmembranaires de type I contenant un segment intracytoplasmique avec une région conservée appelée Toll/IL-1 receptor (TIR) commune au IL-1R et pour lesquels l'ectodomaine est composé de motifs répétés riches en leucine (motifs LRR) qui reconnaissent sélectivement divers PAMP (256). Ces PRR jouent un rôle central dans la reconnaissance des pathogènes et l'initiation subséquente des réponses immunitaires contre ceux-ci. D'ailleurs, les souris dont le gène TLR3 a été inactivé (*tlr3^{-/-}*) ne répondent plus à l'acide polyinosine-

polycytidylique [poly(I:C)] (12), un analogue synthétique des ARN bicaténaires (dsRNA) produits lors d'événements de réplication d'un génome viral dans une cellule infectée; ces souris mutantes sont moins résistantes contre des infections virales (197, 578). L'engagement d'un TLR par son ligand conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, IRF7, IRF3, AP-1 et ATF-2/c-Jun permettant la production des cytokines pro-inflammatoires, des molécules costimulatoires de la famille B7 et des IFN de type 1 (IFN- α/β) qui sont nécessaires à l'initiation de la réponse acquise (voir Figure 7) et à la synthèse de protéines possédant des propriétés antivirales comme la RNase L (se référer à la section 1.2.1). Les TLR (notamment le TLR3, (528)) jouent également un rôle important dans le *crosspriming* (115, 579): la capacité d'acquérir des antigènes externes (par exemple, des cellules infectées apoptotiques) et de les présenter en association avec les CMH-I aux CTL.

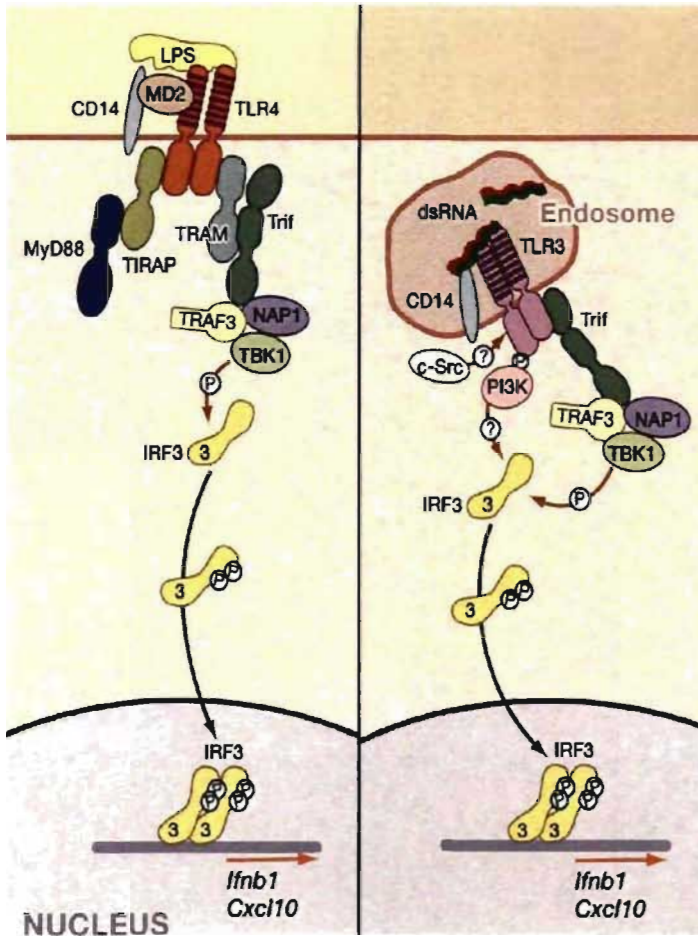
L'adaptateur universel MyD88 est recruté via des interactions homophiliques au niveau du domaine cytosolique TIR de tous les TLR identifiés (à l'exception du TLR3) et active une cascade de phosphorylation impliquant les kinases IRAK-1/4 qui amplifient le message en s'associant à la E3 ligase TRAF6, menant à l'activation de TAK1 et du complexe NEMO (IKK γ)-IKK α/β (8, 582). MyD88 contient un domaine de mort (DD: *death domain*) aminoterminal par l'intermédiaire duquel il interagit avec les sérinethréonine kinases à domaine DD de la famille IRAK (437). MyD88 fonctionne donc comme adaptateur entre les récepteurs à domaine TIR et des kinases impliquées dans la signalisation en aval. Des études génétiques utilisant des souris *Myd88*^{-/-} ont montré que la finalité de la voie MyD88-dépendante est que I κ B α soit phosphorylé à la Ser³² pour induire sa dégradation par le protéasome, ce qui permet la translocation nucléaire de NF- κ B et la transcription de gènes pro-inflammatoires telles l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le TNF- α , le CCL5 et le CCL3 (285). De façon plus surprenante, l'analyse de ces souris *Myd88*^{-/-} a également révélé l'existence d'une voie de signalisation indépendante de MyD88 en aval de certains TLR. En effet, l'induction de NF- κ B par le LPS (TLR4) et les dsARN (TLR3) n'est pas abolie chez les souris *Myd88*^{-/-}, mais seulement retardée (99). En outre, la maturation des DC (traitée à la section 3.2) n'est pas affectée quand des cellules déficientes en MyD88

sont stimulées avec du LPS ou du poly(I:C) (232). L'induction d'IFN- β par le TLR3 et le TLR4 implique également un mécanisme indépendant de MyD88.

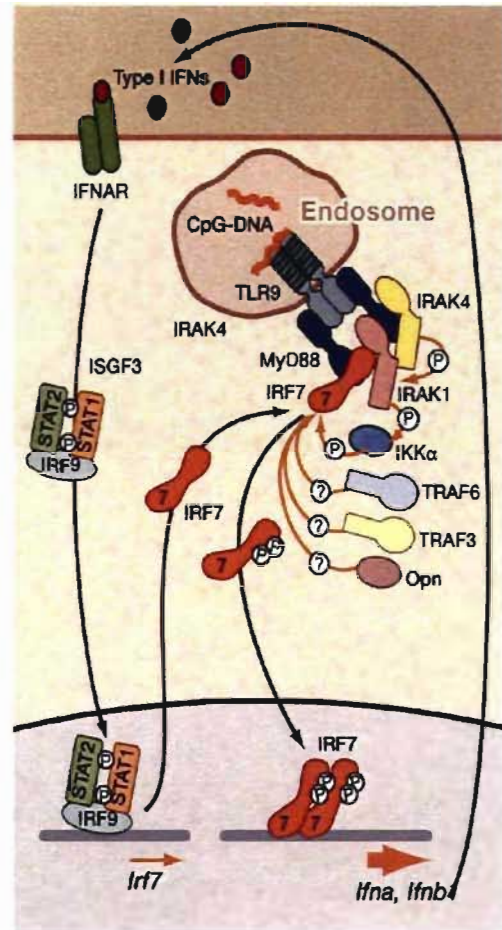
IRAK1 et IRAK4 (577), qui permet la polyubiquitination de TRAF6 sur la lysine K63 par la voie MyD88, ne sont pas indispensables à la voie amorcée par TLR3 (655) puisque ce récepteur fait appel à l'adaptateur alternatif TRIF pour transmettre ses signaux. TRIF n'est toutefois pas spécifique à TLR3, étant également recruté via l'adaptateur TRIF-Related Adaptor Molecule (TRAM) au TLR4 (165). Bien que la voie TRIF-dépendante (partagée par le TLR3 et le TLR4) soit spécialisée dans l'expression d'IFN- β par la dimérisation du facteur transcriptionnel IRF3 suite à sa phosphorylation par les kinases TBK1/IKK ϵ (223, 262, 394, 455, 536), le TLR3 (et à moindre mesure le TLR4) peut néanmoins activer NF- κ B par une voie IRAK-indépendante faisant appel à RIP1 (402) qui, se liant à l'extrémité C-terminale de TRIF via un motif d'interaction homotypique RHIM, recrute le complexe TRAF6-TAB1/2-TAK1 (112, 517). IRF3 aurait également un rôle à jouer dans l'activation du gène de l'IL-12 après liaison des TLR3 et TLR4 (193, 626). L'ensemble de ces données indique qu'il existe deux groupes de TLR (Figure 7 et tableau 3), dont l'un (qui inclut les TLR3 et TLR4) dépend de TRIF pour activer NF- κ B (avec une cinétique plus lente que MyD88) et le facteur IRF3, qui régule l'expression de l'IFN- β .

Figure 7. *Signalisation par les TLR*. Modifié de Honda *et al.* (236). (A) En plus des signaux pro-inflammatoires, les TLR3 et TLR4 ont la capacité d'induire les IFN de type I et les gènes inductibles par l'IFN (exemple CXCL10) de manière indépendante de MyD88 (284). L'adaptateur TRIF (441, 653) est essentiel à la voie MyD88-indépendante (illustré en A) induite par les TLR3 et TLR4 (230, 652); il est également requis pour l'induction des cytokines inflammatoires par le TLR4. L'extrémité N-terminale de TRAM possède un site de myristoylation responsable de sa localisation membranaire qui lui permet d'agir en tant qu'adaptateur reliant le TLR4 à TRIF (506). TRIF interagit avec deux IKK non-canoniques, IKK ϵ et TBK1, conjointement avec TRAF3 (211, 433), afin de phosphoryler IRF3, permettant à ce dernier de se transloquer sous forme de dimère dans le noyau et d'activer le promoteur de l'IFN- β . Les IRF3 (A) et IRF7 (B) phosphorylés forment des homodimères, permettant aux IRF d'interagir avec les co-activateurs CBP pour former un holocomplexe dans le noyau (236) qui se lie ensuite à sa séquence ADN cible et altérerait la structure chromatinienne locale *via* l'activité histone-acétyltransférase des co-activateurs; la transcription des gènes cibles est ainsi initiée. (B) La signalisation des TLR7, 8 et 9 peut induire, non seulement des cytokines inflammatoires, mais également des IFN de type I (notamment l' α). Tous ces effets sont dépendants de MyD88 et d'IRF7 (237). IRF7 peut s'associer directement avec MyD88 (234), formant un large complexe moléculaire inactif. Après liaison du TLR9 par les ADN-CpG dans l'endosome, le lien entre IRF7 et MyD88 est activé par une cascade de protéines kinases qui implique IRAK-4, IRAK-1 (604) et IKK α , en association avec TRAF6. Une activation similaire d'IRF7 se produit après activation du TLR7 et du TLR8 avec des ARN simple-brin. Après l'activation initiale des gènes de l'IFN, la boucle d'amplification entre en jeu, et la participation d'IRF7 (induit par les IFN) est cruciale pour que l'induction des gènes de l'IFN de type I soit complète: la liaison des IFN à leur récepteur (IFNAR) aboutit à l'activation d'un activateur transcriptionnel hétérotrimérique connu sous le nom de ISGF3 (constitué d'IRF9 et STAT1/2) responsable de l'induction du gène *irf7*. Dans le cas du TLR4 (voir A), TIRAP est requis pour l'activation de la voie dépendante de MyD88 (274): cet adaptateur contient un domaine de liaison au phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate qui permet son recrutement à la membrane plasmique, où il aide au recrutement de MyD88 au TLR4 activé pour initier la transduction du signal.

a



b



3.1.1 TLR et immunité adaptative

Tel que mentionné en introduction à cette section, une des fonctions de la réponse innée est d'initier et d'orienter la réponse adaptative. Certains résultats récents montrent que les TLR participent effectivement à l'induction de la réponse adaptative, comme le suggère leur rôle essentiel dans l'immunité innée. Ainsi, des études utilisant des souris *Myd88*^{-/-} (527) et *Tlr4*^{-/-} (561) ont montré que les TLR étaient essentiels pour l'induction d'une réponse adaptative à un antigène administré en présence de LPS. Il est également apparent depuis peu qu'outre l'activation des lymphocytes T conventionnels, le système inné via les TLR inhibe les fonctions suppressives qu'exercent les CD4⁺CD25⁺ (T régulateurs) sur l'initiation d'une réponse primaire (447). Des études complémentaires utilisant des antigènes chimériques (par exemple, OVA fusionné à la profiline *T. gondii*) ciblant les TLR5 (391), TLR7/8 (638, 640), TLR9 (639) et TLR11 (657) ont permis de confirmer l'importance de ces récepteurs *in vivo* dans l'activation des lymphocytes T antigène-spécifiques. Les TLR représentent donc une famille de PRR qui contrôle de multiples aspects de la réponse immunitaire, à la fois innée et adaptative. Les TLR ou les voies de signalisation qu'ils activent représentent autant de cibles potentielles de contournement de l'immunité exploitées par des virus: la protéase du VHC, NS3/4A, clive spécifiquement TRIF, interrompant ainsi la voie en aval de TLR3 (se référer à la section 1.2.1).

3.2 Les cellules dendritiques: notions générales

Les DC sont des leucocytes rares (0.2-0.5% dans le sang) originaires de la moëlle osseuse (121) qui représentent une population hétérogène en périphérie et dont la fonction première est d'assurer la présentation d'antigènes aux lymphocytes T à titre d'initiateur de la réponse immunitaire spécifique. Elles sont des acteurs primordiaux du système immunitaire de par leur situation à l'interface entre l'immunité innée et acquise. Il existe différentes sous-populations présentes en faible quantité dans tous les tissus et caractérisées par des fonctions et des capacités migratoires distinctes. Ce sont les DC de Langerhans qui furent les premières décrites en 1868, mais ce n'est seulement qu'à partir de 1973 que Steinman et Cohn caractérisèrent une population

leucocytaire bien particulière (564). Selon ces auteurs, ces cellules étaient capables de capturer des particules antigéniques nominales, pour venir ensuite dans les LN en présenter les peptides constitutifs aux lymphocytes T dans le contexte d'une restriction CMH, et ce afin d'initier l'activation de la réponse acquise (209, 397, 473, 589).

Il existe diverses sous-populations de DC chez l'être humain, caractérisées par des fonctions distinctes (361, 546). Ainsi distingue-t-on schématiquement deux grands types de DC: les plasmacytoïdes et les myéloïdes. Les DC plasmacytoïdes (PDC) furent identifiées initialement dans les zones T des LN (240, 342) et ont été initialement interprétées par certains comme étant des lymphocytes T plasmacytoïdes (40, 205). Leurs précurseurs circulent en périphérie sous forme d'un contingent cellulaire CMH-II⁺CD4^{hi}CD11c⁻CD123⁺BDCA2⁺ (146) et CD62L⁺ (sélectine-L) (144, 145) qui est spécialisé dans la sécrétion rapide d'IFN de type I (notamment les espèces α) après stimulation via les TLR7 et TLR9 par un virus (97, 229, 360, 550). Kato *et al.* (280) montrent que les DC myéloïdes (MDC) produisent également des IFN- α (131) en réponse à la détection d'une infection virale et qu'elles le font en activant IRF-3 via RIG-I; par contre, dans les PDC (qui sont dépourvues de RIG-I) seul le système TLR proprement dit est utilisé. Pour leur part, les MDC circulantes dans le sang représentent un contingent CMH-II⁺CD4⁺CD11c⁺CD123^{lo}BDCA2⁻ qui n'exprime aucun des marqueurs caractéristiques des autres lignées de leucocytes mononuclées (TCR $\alpha\beta$ CD3 lymphocytes T, CD14 monocytes, CD19 lymphocytes B, CD56 lymphocytes NK) et qui, contrairement aux PDC, déploie un éventail bien plus large de PRR (se référer au tableau 3) pour alerter l'hôte quant à la présence d'agents pathogènes (359). Les monocytes CD14⁺ sanguins, précurseurs des macrophages tissulaires, peuvent dans certaines conditions inflammatoires servir de précurseurs directs des MDC (481, 483, 484, 534). Ces monocytes CCR2⁺CX₃CR^{lo}, dont le profil d'expression des molécules d'adhésion leur permet d'être facilement recrutés dans les sites inflammatoires (PSGL-1⁺CD62L⁺), constituent une réserve de DC rapidement mobilisables qui participent à la capture et à la présentation des antigènes (183).

Tableau 3. *Phénotype et caractéristiques fonctionnels des cellules présentatrices d'antigènes isolées de la périphérie.*

		MDC	PDC	Monocyte	Adaptateur Signalétique	Localisation	Agoniste	
Phénotype	CD3	-	-	-				
	CD4	+	++	+				
	CD8	-	-	-				
	CD11c	+	lo	+				
	CD14	lo	-	+				
	CD16	-	-	+/-				
	CD19	-	-	-				
	CD33	+	lo	+				
	CD45	+	+	+				
			(RO)	(RA)	(RO)			
	CD123 (IL-3R α)	+	++	+/-				
	CD209 (DC-SIGN)	+	-	-				
CD303 (BDCA2) [‡]	-	+	-					
HLA-DR (MHC-II)	++	+	+					
PRR[‡]	RIG-I	+	-		IPS-1	C	dsRNA	
	TLR1/6 [†]	+	lo	+	MyD88	S	lipoprotéines triacylées	
	TLR2 [†]	+	-	++	MyD88	S	Pam ₃ CSK ₄ , hsp90	
	TLR3 [*]	++	-	+	TRIF	E	poly(I:C), dsRNA	
	TLR4 [*]	+	-	++	TRIF MyD88	S	LPS, HMGB1, enveloppes virales	
	TLR5	+	-	+	MyD88	S	Flagelline	
	TLR7 [*]	-	++	-	MyD88	E	R-837, 3M-011	
	TLR8 [*]	++	-	+	MyD88	E	ssRNA40, 3M-011	
	TLR9 [*]	-	++	-	MyD88	E	CpG-2216	
	TLR10	+	lo	+	MyD88			
TLR11	+	-	+	MyD88	S	Profiline		
Fonction(s)	IFN- α/β	+	+++	+				
	Cytokines	++	+	+				
	Phagocytose	+	-	++				
	Mémorisation	+	-	-				
	Polarisation [‡]	+	++	-				

C, cytosol; S, surface cellulaire; E, endosome.

[‡]La répartition des TLR humains sur les DC est adapté de celle décrite par Iwasaki *et al.* (256)

[†]Les TLR1 et 6 forment des hétérodimères à la surface en étroite collaboration avec le TLR2 (à titre de co-récepteurs).

^{*}TLR impliqué dans la détection d'infections virales; mode d'action ne nécessitant pas une réplication virale active.

[‡]Lectine C de type II ayant un rôle dans l'internalisation des antigènes; la réticulation de ce récepteur inhibe la production des IFN de type I (appartenant à la famille des cytokines α -hélicoïdales de classe II) en présence d'agoniste du TLR9 (CpG ODN-2216); cette inhibition participerait à la différenciation des PDC en cellules DC (146, 360).

[‡]Les PDC coopèrent avec les MDC *in vivo* en induisant la différenciation des lymphocytes T non-polarisés ayant rencontré l'antigène préalablement activés par les MDC (58, 360, 509).

Les fonctions des DC sont tout à fait distinctes selon leur stade de maturation (17,18,40). Cela est bien reflété par leur aspect morphologique radicalement différent

et l'expression à leur surface de molécules distinctes. Les MDC sont surtout représentées dans les tissus d'interface avec le monde extérieur. Dans ces positions de sentinelles, les DC sont dites immatures. Elles présentent un phénotype de surface ($CD83^-CD86^+CD40^{dim}CCR7^-$) reflétant leur spécialisation en phagocyte capturant les antigènes où ces derniers, une fois internalisés, sont dirigés vers les compartiments endosomaux MIIC (95, 603) ou vers la voie de présentation croisée sur le CMH-I (2, 208, 242, 306). Aussi ont-elles des récepteurs de chémokines tels CCR5 et CCR6 (113, 558, 559, 617) leur permettant de répondre aux stimuli inflammatoires afin de gagner les foyers où des dangers ont été repérés (452). Après avoir été exposées aux signaux de danger PAMP, les MDC subissent un processus de maturation se traduisant par une modification profonde de leur phénotype (80, 511). Elles vont non seulement s'équiper pour interagir efficacement avec les lymphocytes T (changement du phénotype de surface $CD83^+CD86^{hi}CD40^+$ et synthèse de cytokines telles l'IL-2 (201, 203), IL-12 (374, 557), IL-23 (439) et l'IL-27 (458)), mais vont, en plus, changer de phénotype migratoire (135). Ce faisant, elles peuvent quitter les tissus et gagner les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront rencontrer les lymphocytes T naïfs et leur présenter les peptides apprêtés sur leurs molécules du CMH-I et II (CMHp), activer une réponse primaire et moduler la force, la durée et la qualité des réponses déjà engagées (mémorisation) (512).

L'expression des molécules CMH et costimulatoires peut également être augmentée à la surface des DC activées indirectement par les médiateurs de l'inflammation tels que l'IFN- α/β ou le TNF- α ; toutefois, ces DC sont incapables de produire de l'IL-12 (signe d'un reprogrammage transcriptionnel plus vaste) et sont, conséquemment, incapables d'induire la différenciation des $CD4^+$ en cellules effectrices (561). Ainsi, les DC utilisent les signaux de l'inflammation afin de détecter la présence d'un danger potentiel en périphérie; toutefois elles nécessitent, simultanément avec la rencontre de l'antigène, l'engagement direct de leurs PRR (notamment les TLR) par des PAMP afin de stabiliser les complexes peptide-CMH-II à leur surface (leur demi-vie passe ainsi de dix à 100 heures), d'augmenter leur pouvoir de costimulation et d'activer spécifiquement les lymphocytes T. Les DC, lorsqu'elles présentent des

antigènes en dehors d'un contexte de danger, acquièrent des propriétés tolérogènes, c'est-à-dire qu'elles paralysent ou éliminent les lymphocytes T correspondant à ces antigènes (voir la section 4). En conclusion, l'ensemble coordonné de ces modifications fonctionnelles qui accompagnent la maturation permettent aux DC d'intégrer l'information issue du système inné et d'assister les lymphocytes T à faire la distinction entre peptides du soi et peptides dangereux, pour lesquels il est habituellement désirable de provoquer une immunoréaction (489).

3.2.1 *Interaction cellule dendritique/lymphocyte T naïf*

Une fois dans le ganglion, les DC activées sont présentes à la sortie des veinules post-capillaires, porte d'entrée utilisée par les lymphocytes naïfs. Leur vitesse est faible ($<6 \mu\text{m} \times \text{min}^{-1}$) relativement à celle des lymphocytes ($10\text{-}12 \mu\text{m} \times \text{min}^{-1}$) et elles émettent de longues dendrites. La durée des interactions antigène non-spécifique entre cellules T/DC est très courte, de l'ordre de la minute (406); tous ces paramètres permettent un maximum de contacts entre les deux types cellulaires alors que la cellule T sonde la DC pour la présence de CMHp reconnu par son TCR (123). Ainsi, les estimations du nombre de lymphocytes contacté par une seule DC en une heure sont comprises entre 500 (62) et 5000 (405). Or, en considérant comme point de départ une fréquence de l'ordre de 1×10^{-5} lymphocyte spécifique pour un antigène donné dans la population naïve (22, 54), on peut estimer qu'aussi peu que 20 à 200 DC présentant un CMHp de spécificité donné suffisent pour détecter et activer une cellule naïve spécifique de ce CMHp par heure.

Lorsque le CMHp est perçu par le lymphocyte T naïf qui lui est spécifique, ce dernier diminue sa vitesse ($4 \mu\text{m} \times \text{min}^{-1}$) pour ensuite s'arrêter et établir des contacts prolongés de l'ordre de plusieurs heures avec la DC (82, 399). L'activation du lymphocyte par la DC semble s'être complétée à cette étape avec l'organisation de la synapse immunologique: polarisation de molécules membranaires (TCR, LFA-1), exclusion de certaines molécules (CD43) et acquisition des capacités à sécréter des cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α) (392, 567). Enfin, une vingtaine d'heures après la détection des CMHp, les lymphocytes se détachent des DC et enclenchent la première d'une série de division cellulaire rapide (toutes les 6 à 8 heures) au cours desquelles

l'interphase est réduite à son minimum (81). Ces divisions conduisent les lymphocytes spécifiques du CMHp à augmenter dans des proportions considérables leurs nombres. L'exemple le mieux décrit est celui de l'expansion lymphocytaire induite par l'infection au LCMV qui conduit environs 100 CD8^+ naïfs spécifiques à se diviser une vingtaine de fois pour générer $20 \times 10^6 \text{ CD8}^+$ effecteurs huit jours post-infection (417). D'autre part, le nombre de divisions effectuées n'est pas proportionnel à la quantité d'antigène ni à la durée du signal antigénique initiale. En effet, Kaech *et al.* montrent clairement qu'un faible nombre de DC activés présentant l'antigène n'induit pas un nombre de divisions plus faible mais plutôt la prolifération d'un nombre restreint de clones spécifiques (271). Le système immunitaire adaptatif est donc mis en action via les DC.

En contrepartie, puisqu'elles sont si efficaces en tant que sentinelles qui orchestrent l'induction des réponses acquises au niveau des tissus lymphatiques, les DC, à leur insu, sont susceptibles d'être activement ciblées par les pathogènes désirant persister chez l'hôte. D'ailleurs, notons l'exemple des *herpesviridae* qui infectent très efficacement les DC bien que le cycle viral y soit très peu productif, s'avérant même abortif (266, 492). Au lieu d'employer ces cellules comme réservoir de production, les herpesvirus interfèrent activement avec leur capacité à induire une réponse immunitaire protectrice (18, 225, 308, 480) et, dans certains cas, ils vont même à les utiliser comme vecteur de relais pour faciliter leur dissémination en *trans* à travers les tissus permissifs de l'hôte (212). L'étude de l'interaction du VHC avec ces acteurs innés, ainsi que le rôle de leurs PRR dans le contexte de cette infection, recèlent certainement des informations clés qui permettraient d'expliquer la perte des corrélats de protection décrits dans la deuxième section de ce chapitre.

3.3 Les cellules dendritiques en tant que réservoir viral du VHC

L'appartenance du VHC à la famille des *flaviviridae* a d'emblée fait entrevoir la possibilité d'une infection des cellules du système immunitaire. L'existence de variants lymphotropes différents des variants hépatotropes a été évoquée initialement devant la réplique préférentielle dans des lignées cellulaires d'origine lymphoïde des variants isolés des lymphocytes périphériques d'un chimpanzé infecté

expérimentalement (543). La notion de réservoirs extrahépatiques d'origine hématopoïétique du VHC est progressivement devenue à partir de 1992 (60) une référence obligée pour expliquer certaines propriétés de l'infection chronique par ce virus. Plus précisément, l'existence de réservoirs au sein des DC expliquerait l'échec spécifique du système immunitaire à contrôler la virémie sans pour autant induire une immunodéficience généralisée et serait un des principaux obstacles à l'éradication de l'infection virale lors de la phase aiguë (voir la section 4). Ce qui n'était qu'une hypothèse scientifique, étayée par des données pertinentes mais préliminaires (343), est devenu un paradigme susceptible d'orienter les futures stratégies thérapeutiques vis-à-vis du VHC. Pourtant, à l'analyse, les données qui sous-tendaient initialement le concept de réservoir perturbant la fonction immunogénique des DC étaient fragiles et aucune investigation complémentaire n'est venue apporter la confirmation définitive de ce concept. Au contraire, certains résultats récents le remettent en question (322, 362, 388) et, de plus, il semble s'installer une certaine confusion puisque différents auteurs utilisent le même vocable, celui de réservoir, pour décrire des phénomènes distincts. Pour ces auteurs, les DC ne constituent pas l'une des principales cibles des effets délétères du virus, que ces effets soient directement viro-induits après une interaction avec des récepteurs cellulaires ou provoqués par la création d'un réservoir au sein de cette population. Sur la base de leurs données expérimentales, ces cellules ne peuvent bénéficier du qualificatif de réservoir puisqu'il n'y a pas d'arguments pour affirmer qu'il existe, dans ces sites, une population virale autonome, distincte de celle présente dans la circulation générale (332), d'autant que les fonctions de présentation d'antigène des DC de sujets VHC-infectés ne sont pas compromises (365). Les défauts observés par d'autres études ne seraient plutôt qu'une conséquence passive de pathologies secondaires émanant d'une virémie plasmatique élevée lors de la persistance.

En ce sens, le réservoir doit être distingué du site de production primaire dans lequel le virus se multiplie activement sans provoquer de signes majeurs au début d'une infection aiguë et, *a fortiori*, des organes cibles dans lesquels il se multiplie activement ensuite pour donner les signes cliniques et/ou biologiques de la maladie. Un exemple en est fourni par le virus de l'herpès simplex (VHS) qui persiste à l'état

latent dans les neurones d'un ganglion nerveux sensitif et qui peut épisodiquement se réactiver pour donner une récurrence clinique à localisation cutané-mucosale (38, 265). Dans les neurones sensitifs, le VHS latent persiste sous la forme de son génome isolé (ADN épisomal) avec, pour seule activité décelable, la production de quelques transcrits de latence. Un site de production extrahépatique du VHC, entièrement autonome vis-à-vis du tissu hépatique où se réplique activement le virus, existe peut-être. Mais la notion de réservoir dans les DC suppose un fonctionnement intermittent de l'infection avec des périodes durant lesquelles tout signe d'infection active disparaît et le virus reste cantonné dans le réservoir. La section suivante fait état des connaissances publiées relativement à la permissivité des DC face au VHC.

3.3.1 Détection du génome viral: évidence d'une réplication virale dans les cellules dendritiques périphériques

Des évidences partielles colligées à partir de plusieurs travaux publiés montrent l'existence de constituants viraux, dont notamment la présence d'ARN génomique parmi les DC (600) et les précurseurs monocytaires CD14⁺ (344, 476, 500) isolés de patients chroniquement infectés. Toutefois, ces données de PCR qui sont dans la grande majorité de nature qualitative, ne permettent pas de déterminer si le virus a transféré son matériel génétique dans le cytosol suite à la fusion des membranes et de conclure sans équivoque à une permissivité cellulaire véritable puisque les séquences amplifiées peuvent aussi bien provenir de particules adsorbées à la surface ou encore d'ARN encapsidé retenu dans des phagosomes. Comme mentionné dans la section 1.1, le VHC, lors de sa réplication, synthétise une matrice de réplication de polarité négative complémentaire au génome. La détection de cette matrice par PCR constitue ainsi l'un des seuls arguments exploités à l'heure actuelle pour montrer que le compartiment cellulaire analysé soutient la traduction du génome et la réplication active du virus. Néanmoins, il existe, dans ces sites, une population virale autonome, phylogéniquement distincte de celle présente dans la circulation générale et dans le foie (75, 141, 376, 423).

L'ARN de polarité négative a été détecté dans les monocytes (331, 514). La détection de l'ARN de polarité négative n'est toutefois pas une preuve d'infection productive et

ne constitue qu'un marqueur biochimique suggérant que la réplication du génome viral (qui signe des événements récents de traduction du génome) s'est déroulée jusqu'à cette étape. L'existence d'une infection répliquative pour les DC n'est que peu documentée. Mellor *et al.* (398) et Goutagny *et al.* (195) ont démontré respectivement la présence d'ARN viral de polarité négative, signe d'une réplication active, au sein d'une population leucocytaire enrichie par immunomagnétisme en DC CD3⁻CD19⁻CD4⁺CMH-II⁺ périphériques chez 10 et 12.5% des cas chroniquement infectés à l'étude, ce qui laisserait suggérer qu'il y a peut-être une association répliquative avec une rare sous-population cellulaire résultant dans la dilution d'un signal PCR par les cellules décrites comme étant non-permissives *in vivo*.

En résumé, les deux phénomènes, circulation de DC sanguines infectées et chronicité, sont en effet corrélés mais non strictement interdépendants. Dans certains cas, par exemple chez des chimpanzés, la circulation de DC infectées et dysfonctionnelles peut être indétectable alors que la virémie plasmatique reste paradoxalement très élevée (329, 498). Les différences de réponse à l'infection VHC du chimpanzé, modèle animal permissif, et de l'homme limitent cependant la comparaison. L'implication directe de la présence du génome ou des protéines virales dans l'apparition d'un défaut dans les DC *in vivo* reste à démontrer.

4. ARTICLE DE REVUE

Tel que décrit dans les sections précédentes, l'infection par le VHC s'accompagne de la perte de la capacité des lymphocytes T mémoires à contrôler la réplication virale; les causes de cet état dysfonctionnel ne sont pas encore bien comprises. Plusieurs travaux récents ont montré que les DC présentant des voies de signalisation compétentes via les TLR sont les initiateurs qui fournissent toutes les interactions costimulatoires nécessaires au bon contrôle du sort des cellules T naïves lors de leur activation et de la génération d'une mémoire immunitaire fonctionnelle (299, 447-449, 527). À titre d'exemple, les résultats de l'équipe de Medzhitov (527) avec des souris *Myd88*^{-/-}, soit l'incapacité de transmettre un signal de danger via les TLR, soulignent l'importance qu'a la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les MDC dans l'activation des CD4⁺ (258). À l'aide de l'article de revue qui suit, nous

allons illustrer en quoi les DC détiennent un rôle clé dans l'initiation des réponses adaptatives anti-VHC et comment la persistance virale semble due au désamorçage de leur capacité à activer l'immunité acquise de l'hôte via une interférence avec leurs TLR reconnaissant les PAMP du VHC. Celles-ci viennent à être ciblées par le VHC et se retrouvent alors incapables de produire ou de maintenir à long terme des réponses mémoire anti-VHC protectrice. Ainsi, nous entendons contribuer au débat actuel sur le rôle controversé des DC, en les plaçant comme intermédiaire critique entre le VHC et la qualité des réponses acquises développées, une perspective jusqu'ici peu explorée, mais dont l'étude ne peut que continuer à révéler des indices concernant les mécanismes qui sous-tendent l'échec de l'immunité acquise à éradiquer l'infection chez l'être humain. Cet article a été soumis à la revue *Médecine Sciences* et est reproduit ici avec l'accord du co-auteur.

LES CELLULES DENDRITIQUES, ACTEURS IMMUNITAIRES OU CIBLES DU VIRUS DE L'HÉPATITE C

Ian Gaël Rodrigue-Gervais^{1,2,3} et Daniel Lamarre^{1,2,4,5*}

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,¹ INSERM U743,² Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1, Département de Microbiologie et Immunologie,³ Département de Médecine,⁴ et Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie,⁵ Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Running title: Cellules dendritiques et VHC

(Soumis à Médecine Sciences)

***Adresse de correspondance.** Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Saint-Luc, 264 boul. René-Lévesque Est, Local EA-312, Montréal, Qc, H2X 1P1. Téléphone: 514-8908000-35258. Fax: 514-4127314. Courriel:



[Résumé: 228 mots; Texte: 3 020 mots]

RÉSUMÉ

L'infection chronique par le VHC s'avère un problème de santé publique d'une importance grandissante, affectant à ce jour 3% de la population mondiale. L'aide inadéquate des CD4⁺ VHC-spécifiques est très largement perçue comme responsable de l'échec des CD8⁺ à contenir l'évolution de cette infection vers sa forme chronique. Mais les différents mécanismes qui s'imbriquent chez l'hôte pour aboutir à l'échec de cette immunité CD4⁺ et permettre au VHC d'y établir une infection persistante sont peu compris. De façon générale, les virus qui désirent persister chez l'hôte ne se comportent pas en tant qu'antigènes inertes une fois reconnus par les acteurs du système inné comme les cellules dendritiques (DC), lesquelles interagissent avec les lymphocytes T afin d'initier l'activation de la réponse CD4/CD8. D'ailleurs, les DC sont en effet un hôte viral pour le VHC qui, au lieu d'employer ces cellules comme réservoir de production, interfère activement avec leur capacité à capter des signaux de danger via leur *Toll-like receptor* (TLR) pour déjouer l'immunité innée. Des travaux récents ont, de plus, fait apparaître la nécessité qu'ont les acteurs du système inné de posséder des TLR fonctionnels pour générer une mémoire CD4⁺ protectrice. La perte de la réceptivité des TLR dans les DC infectées représenterait donc un mécanisme spécifique qui constituerait à lui seul un élément permettant de rendre compte de la perte de la mémoire CD4⁺ VHC-spécifique observée dans l'infection.

INTRODUCTION

Bien que l'infection au VHC soit l'une des maladies infectieuses chroniques les plus répandues, les mécanismes responsables de la persistance virale demeurent peu compris. La persistance peut dépendre de la qualité de la réponse immunitaire (50). Des preuves empiriques d'une dysfonction des CD8⁺ VHC-spécifiques proviennent d'études détaillées du phénotype, fondées sur des mesures de fluorescence des interactions tétramériques HLA/peptides du VHC réalisées au cours de l'infection chronique. Ces études ont noté dans une comparaison parallèle avec les CD8⁺ spécifiques pour d'autres virus comme ceux de l'influenza A, du cytomégalovirus (CMV) ou du virus d'Epstein Barr, que la réponse T cytotoxique (CTL) VHC-spécifique, bien que régulièrement détectée, était peu différenciée et contenait des

niveaux bien plus faibles de perforines dans les granules cytotoxiques (3). Ces anomalies dans la fonction des CD8⁺ peuvent être la conséquence d'une aide CD4⁺ antigène spécifique insuffisante, tel que documentée pour d'autres infections virales persistantes (54). Aussi, chez le chimpanzé et chez l'être humain, la réponse précoce VHC-spécifique CD4⁺ est fortement corrélée avec l'éradication virale alors que la persistance de la virémie est positivement corrélée à la perte des effecteurs CD4⁺ (16, 18). Il n'est pas impensable que l'insuffisance de cette réponse soit en partie directement liée à la qualité des signaux activateurs transmis par les cellules dendritiques (DC). Les DC sont les seules présentatrices d'antigènes professionnelles du système inné en mesure d'activer une réponse primaire à partir des cellules T naïves et de conduire à l'établissement d'une mémoire immunologique CD4⁺ compétente (26). L'inhibition des fonctions de l'immunité innée, qui intervient rapidement contre les envahisseurs externes suite à la reconnaissance de motifs conservés et portés par ces pathogènes (PAMP), est un mécanisme connu par lequel les virus éludent les défenses adaptatives pour persister chez l'hôte. Par conséquent, un dysfonctionnement du rôle des DC dans le cadre de l'infection VHC compromettrait la qualité des CD4/CD8 qui réagissent contre les antigènes viraux du VHC.

Les données *in vivo* justifiant cette position sont peu nombreuses. Le rôle physiologique de ces cellules dans l'infection a été surtout inféré par l'étude de cohortes hétérogènes avec des systèmes de dérivation *in vitro* des DC (Mo-DC), dont les résultats se sont avérés non concluants. Plusieurs équipes de chercheurs ont en effet suggéré que les fonctions de présentation d'antigène des DC ne sont pas compromises et que les défauts observés sont plutôt une conséquence passive de pathologies secondaires émanant d'une virémie plasmatique élevée (34, 36, 37, 44, 47). De plus, sur la base des données expérimentales obtenues par ce type d'études, les DC ne peuvent bénéficier du qualificatif de réservoir puisqu'il n'y a pas d'arguments pour affirmer qu'il existe, dans ces sites, une population virale autonome, distincte de celle présente dans la circulation générale. Les niveaux d'infection des DC sanguines isolées de patients chroniquement infectés au VHC sont évalués entre 0.1% à 1% (13); cependant, même des niveaux de moins de 1% sont

capables d'affecter la stimulation antigène-spécifique dans une infection VIH (19,20). Aussi, l'existence d'un réservoir qui exercerait une pression inhibitrice sur la fonction des DC est devenue une hypothèse plus ou moins écartée. Néanmoins, la présence d'ARN viraux du VHC ainsi que sa matrice de réplication ont été détectés parmi les DC isolées de patients chroniquement infectés (6, 17, 58).

Aussi, notre exposé poursuit trois objectifs: en premier lieu, illustrer comment les DC sont au cœur des relations qui façonnent l'immunité adaptative; deuxièmement, mettre en évidence les nombreuses données expérimentales en faveur d'une interaction virus-hôte négative entre les DC et le VHC; enfin, montrer que l'hypothèse postulant l'existence d'un défaut sélectif aux DC ciblées par le VHC rend compte adéquatement des données expérimentales disponibles en ce qui a trait à l'absence d'immunodéficience généralisée chez les patients infectés (principale critique levée contre celle-ci) et permet d'expliquer en partie l'échec spécifique du système adaptatif à contrôler l'infection au VHC chez l'être humain.

Les cellules dendritiques: au carrefour de l'immunité innée/adaptative

Les DC sont des leucocytes rares (0.2-0.5% dans le sang) et dont la fonction première est d'assurer la présentation d'antigènes aux lymphocytes T à titre d'initiateur de la réponse immunitaire spécifique (adaptative). Elles sont des acteurs primordiaux de par leur situation à l'interface entre l'immunité innée et adaptative: elles expriment les *Toll-like receptor* (TLR, composante innée) dont l'activation, via certains signaux de danger codés par des agents infectieux, initie et oriente la réponse adaptative (27). Il existe diverses sous-populations de DC chez l'être humain, caractérisées par des fonctions distinctes. Ainsi distingue-t-on deux grands types de DC: les plasmacytoïdes (PDC) et les myéloïdes (MDC). Les PDC circulent en périphérie sous forme d'un contingent cellulaire spécialisé dans la sécrétion rapide d'IFN de type I après stimulation via les TLR7 et TLR9 par un virus (23). Pour leur part, les MDC circulants dans le sang déploient un éventail bien plus large de TLR pour alerter l'hôte quant à la présence d'agents pathogènes (virus, bactérie). Les MDC sont surtout représentées dans les tissus d'interface avec le monde extérieur. Dans ces

positions de sentinelles, les MDC sont dites immatures, reflétant leur spécialisation en phagocyte capturant les antigènes. Après avoir été exposées aux signatures PAMP, elles subissent un processus de maturation qui les équipe pour interagir efficacement avec les lymphocytes T et activer une réponse naïve (primaire). Les PDC ne sont pas essentielles pour ce qui relève de l'initiation des réponses primaires, étant plutôt spécialisées dans la modulation de la force, de la durée et de la qualité des réponses déjà engagées par les MDC (9). Ce contrôle coordonné fournit au système immunitaire une plus grande flexibilité quant à la forme des réponses adaptatives qui se développent (T_H1/T_H2). En contrepartie, puisqu'elles constituent un maillon clé de l'induction de la réponse immunitaire qui limite l'infection au VHC, elles sont susceptibles d'être activement ciblées par les stratégies d'évasion mises en place par ce virus.

Les cellules dendritiques en tant que cibles du VHC

Depuis la parution de l'étude de Hiasa *et al.* (21), les DC ont pris de l'importance en tant qu'acteur et cible probable du VHC. Cette étude préliminaire indique l'existence d'une inefficacité allostimulatrice associée à une réduction du niveau d'expression d'IL-12 dans des DC exprimant des protéines virales du VHC. L'IL-12 est une interleukine hétérodimérique formée par l'association covalente des chaînes légères α (p35) et lourdes β (p40) nécessaire à l'accumulation *in vivo* d'une mémoire effectrice $CD4^+ T_H1$ capable de sécréter de l'IFN- γ (57). Quelques travaux ont montré que la capacité allostimulatrice des Mo-DC de sujets virémiques non traités était inhibée, contrairement à celle de donneurs avirémiques traités aux IFN- α_2 ou sains (4, 6, 29). Une réduction des fonctions stimulatrices des MDC sanguines est d'ailleurs rapportée chez les cas chroniques sans régime antiviral qui présentent des MDC synthétisant, lors de l'activation par les TLR, des quantités insuffisantes d'IL-12 (2, 30). Aussi, la présence de MDC dysfonctionnelles pourrait être directement impliquée dans le déclin des $CD4^+$ et $CD8^+$ VHC-spécifiques *in vivo*. L'observation d'une corrélation positive entre l'IL-12 produit par les MDC et la fréquence d'effecteurs $CD4^+$ VHC-spécifiques chez des sujets virémiques (2, 11) est en accord avec cette idée.

En ce qui concerne l'interaction soupçonnée entre le VHC et les DC, de récents travaux suggèrent qu'elle pourrait être amorcée par l'internalisation par endocytose du VHC à partir du milieu extracellulaire par le biais de la lectine CD209 exprimée qu'à la surface des DC (45). L'importance de CD209 en tant que récepteur viral spécifique est soulignée par le fait qu'il lie les motifs N-glycanes riches en mannose de plusieurs autres protéines d'enveloppe virale dont notamment la gp120 du VIH (15). Une série d'arguments d'ordre taxonomique et empirique viennent aussi renforcer la notion que ce virus hépatotropique puisse démontrer *in situ* un tropisme pour les MDC. Notamment, l'infection des Mo-DC, via l'endocytose médiée par le récepteur CD209, permet la réplication virale d'un flavivirus apparenté (virus de dengue) dans ces hôtes cellulaires (56). De plus, dans le cas du VHC, des études confirment *in vitro* le rôle des lectines de type C mannose-spécifique dans l'entrée du virus et la réplication dans des MDC (1, 28, 39). Ces observations démontrent le rôle que peut exercer les lectines comme CD209 dans le tropisme cellulaire du VHC et permet d'étayer l'hypothèse sur la nature infectieuse de l'interaction entre les DC et le VHC.

L'association entre le VHC et un défaut de présentation antigénique est désormais largement documentée. Certaines études rapportent même l'implication directe d'une infection et l'expression des protéines du VHC dans l'apparition de ce défaut (48, 58). Ces observations sont cohérentes avec la détection du génome viral répliatif dans les DC circulantes. Si un certain consensus s'établit quant à la présence d'ARN viraux dans les DC de sujets virémiques, la conséquence immunologique de la détection de ces séquences demeure ambiguë. De fait, les deux phénomènes, circulation de DC infectées et chronicité, sont en effet corrélés mais non strictement interdépendants. Dans certains cas, par exemple chez les chimpanzés et dans une moindre mesure chez l'être humain, la circulation de DC infectées et dysfonctionnelles peut être indétectable alors que la virémie plasmatique demeure paradoxalement très élevée (34, 46, 47). Toutefois, dans la majorité des cas chez l'être humain, la présence du génome du VHC dans les DC, mesurée avec les techniques sensibles de RT-PCR, est corrélée au profil résolutif (7, 46) et sa diminution sous traitement IFN- α_2 est associée à une restauration des fonctions allostimulatrices de ces cellules (59).

Détournement de la transduction des signaux de danger captés par des TLR dans les cellules dendritiques ciblées par le VHC

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires pour lesquels le domaine extracellulaire est composé de séquences répétées riches en leucine qui reconnaissent sélectivement les signaux d'alerte codés par divers pathogènes, les PAMP. Les TLR jouent un rôle central dans la reconnaissance des pathogènes par les DC et l'initiation subséquente des réponses immunitaires contre ceux-ci (49). Ainsi, le TLR4 (membranaire) détecte l'endotoxine lipopolysaccharide de la paroi des bactéries GRAM négatives et le TLR3, de localisation endosomale, reconnaît les ARN bicaténaires produits lors d'événements de réplication d'un génome viral dans une cellule infectée (55). Récemment, le TLR4 a été décrit comme un récepteur qui reconnaît également des glycoprotéines virales telle la protéine de fusion F du virus respiratoire syncytial (33). L'engagement de ces deux TLR conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3 permettant la production des cytokines inflammatoires et des IFN de type 1 (IFN- α/β) qui sont nécessaires à l'initiation de la réponse adaptative par les DC (12) (voir figure 8). Effectivement, l'invalidation des adaptateurs spécifiques à ces TLR conduit à des anomalies de fonctionnement de l'immunité innée en lien avec l'activation du système adaptatif chez la souris. L'observation que les DC issues de souris *Myd88*^{-/-} (41), *Traf6*^{-/-} (31), *Tram*^{-/-} (62) et *Trif*^{-/-} (61) sont déficientes dans leur capacité à sécréter des cytokines (IL-12, TNF- α) et à stimuler une réponse antigène spécifique, alors que l'expression des molécules de costimulation est inchangée, montre l'incapacité que ces cellules ont à potentialiser l'activation fonctionnelle de CD4/CD8 en l'absence d'une signalisation médiée par les TLR (51). Puisque la signalisation via ces TLR paraît donc centrale à l'induction des gènes antiviraux, à l'apprêtement et à la présentation d'antigènes (en régulant la maturation des phagosomes (8)), ainsi qu'à la génération de réponses T compétentes, plusieurs stratégies virales de rétrocontrôle négatif ont pu être mises en œuvre pour éviter l'effet de la reconnaissance d'un PAMP viral par la famille des TLR (22).

Plusieurs moyens d'inhibition du TLR3 ont été décrits récemment pour le VHC; ce récepteur détecte l'ARN du VHC. L'un d'eux fait intervenir le ciblage protéolytique de l'adaptateur TRIF en Cys³⁷² par l'activité protéase de la NS3/4A (35). La production d'IFN- β après stimulation par le TLR3 ou TLR4 requiert la protéine TRIF qui sert d'adaptateur pour recruter TBK1, une kinase responsable de l'activation d'IRF3. D'ailleurs, l'IFN- β est l'un des principaux agents antiviraux de l'immunité innée contre le VHC (43). Un autre moyen fait intervenir la région hélicase de la NS3 qui entre en compétition directe avec IRF3 pour sa liaison à TBK1, empêchant ainsi la dimérisation et la phosphorylation d'IRF3 par cette dernière (40). Il semblerait alors que l'un des rôles physiologiques de la protéase NS3/4A dans des cellules infectées soit de prévenir l'induction d'IFN- β suite à la phosphorylation et l'activation d'IRF3 par la voie TRIF-dépendante du TLR3. Les signaux découlant de la reconnaissance des IFN de type 1 (α/β) sont exigés pour l'activation des DC après l'engagement du TLR3 ou du TLR4. En effet, les DC issues de souris *IfnaR1*^{-/-} (14), *Trif*^{-/-} ou porteuse d'une protéine TRIF mutée ne produisent pas d'IL-12 et de TNF- α en réponse au TLR3 et TLR4 (24, 61), montrant que l'utilisation autocrine de l'IFN- β produit par la voie TRIF-dépendante est exigée pour l'induction de ces cytokines dans ces cellules. Nous avons démontré que les niveaux d'expression d'IL-12 et de TNF- α suivant l'engagement du TLR3 et du TLR4 sur les MDC corrélaient négativement avec les niveaux d'ARN génomique du VHC présent dans les DC circulantes de patients virémiques (46). L'atténuation de la réponse innée n'est pas corrélée avec des déficits dans la fréquence des MDC chez ces patients ni avec la virémie. Combinées, nos données indiquent que les interactions virus-hôte entre le VHC et les MDC et la perte de fonction des TLR utilisant l'adaptateur TRIF ne sont pas des phénomènes indépendants. D'autres recherches ont confirmé que les MDC ont des réductions importantes de leur capacité à synthétiser l'IL-12 dans le contexte de l'infection au VHC après engagement du TLR3 et plus récemment du TLR4 (2, 5, 11).

Ces résultats montrent qu'il y a un lien entre la réceptivité des MDC à ces TLR et la détection quantitative du génome viral, suggérant que certaines protéines virales

interdisent de manière sélective aux signaux de danger d'être convenablement transmis par la voie TRIF-dépendante dans des MDC ciblées. Un tel phénomène n'est pas s'en rappeler l'infection par le virus de la vaccine pour lequel la protéine A46R, produit lors du cycle de réplication dans les DC, est connue pour être un antagoniste des cascades de signalisation du TLR3 et du TLR4 en interdisant l'induction des gènes TRIF-dépendant (52). Gautier *et al.* (14) ont montré récemment que les DC déficientes pour des composants essentiels pour les signaux d'IFN de type 1 (i.e. la molécule effectrice *Stat1*^{-/-}) produisaient des quantités réduites d'IL-12 après stimulation par le TLR3 et le TLR4 contrairement à celles issues de souris sauvages. Tout porte à croire que cet engagement des TLR sur les DC mène à l'expression endogène d'IFN de type 1 qui, une fois sécrété, synergise avec NF-κB pour obtenir la production optimale de certaines cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, les caractéristiques fonctionnelles des DC humaines contenant de l'ARN du VHC, évoque la possibilité intéressante que le VHC pourrait invalider cette boucle régulatrice en faisant intervenir l'expression de la NS3/4A et d'autres protéines virales suite à une infection des MDC.

L'effet d'une infection VHC des cellules dendritiques sur la réponse adaptative

Les antigènes qui sollicitent le système immunitaire dans des conditions d'absence de signaux de danger résulte en une anergie, un épuisement fonctionnel et/ou une élimination clonale (au moins des clones les plus affins) de la réponse cellulaire T qui aboutit, dans tous les cas, à un état de tolérance vis-à-vis de l'antigène reconnu (38, 53). Donc, le phénotype affiché par les MDC contenant du VHC pourrait convertir une rencontre avec une cellule T en un événement de tolérance; c'est là l'issue qui caractérise la présentation antigénique dans des souris *Myd88*^{-/-} et *Traf6*^{-/-} qui sont incapables de produire des cytokines inflammatoires à la suite de l'engagement de leur TLR (31, 41). Cette tolérance périphérique est strictement spécifique de l'antigène et récessive, c'est-à-dire qu'elle ne concerne que les cellules T qui ont effectivement reconnu des peptides sur des DC inactives. Aussi, nous pouvons avancer que ce mécanisme d'évasion de la détection par les TLR dans les MDC est l'une des stratégies exploitées par ce virus pour induire l'effondrement des réponses

CD4/CD8 VHC-spécifique sur lesquelles repose la protection et, ainsi, favoriser sa persistance chez l'hôte. D'ailleurs, Pasare *et al.* (42) ont démontré que l'expression de cytokines via les TLR chez des DC n'est requise que pour la différenciation de cellules naïves en mémoire CD4⁺, et non pour l'activation d'une mémoire déjà établie. L'inhibition de la transcription de gènes TLR-inductibles comme l'IL-12 et le TNF- α dans des MDC ciblées par le VHC (les mêmes qui présentent des antigènes du virus) suggèrent que celles-ci sont probablement défectueuses *in vivo* dans leur capacité à potentialiser une réponse naïve VHC-spécifique qui conduit à l'élaboration d'une mémoire fonctionnelle de longue durée (mémorisation). La capacité des PDC à activer la mémoire antigène spécifique, alors qu'elles demeurent moins efficaces que les MDC dans l'activation de T naïves, notamment vis-à-vis des CD4⁺ (32), fournit une explication aux observations précédentes faisant cas de la préservation des réponses mémoires aux autres virus tels que le CMV (36, 50) et ce, malgré une mémorisation déficitaire dans les individus infectés au VHC (25, 60). Cette idée se trouve appuyée par la démonstration que les PDC sont fonctionnelles (10) et se révèlent n'être qu'un hôte viral incompetent pour le VHC par opposition aux MDC, qui intériorisent le virus et exécutent les étapes préliminaires dans la réplication du génome (28). Ainsi le VHC peut échapper à la réponse immune dirigée contre ses antigènes, sans toutefois induire une immunosuppression généralisée.

CONCLUSION

En résumé, les données accumulées dans la littérature jusqu'à ce jour suggèrent que le VHC exerce des effets inhibiteurs profonds sur le fonctionnement des MDC infectées, freinant peut-être le développement d'une immunité adaptative efficace. Les données publiées soutiennent l'idée d'un mécanisme d'évasion immunitaire qui n'interfère qu'avec les fonctions des cellules ciblées, celles-là même qui présenteront les antigènes du VHC aux lymphocytes. Sur la base de la littérature exposée ici, nous avons présenté un mécanisme plausible et spécifique expliquant en quoi les DC ciblées par le VHC sont incapables de répondre à des signaux de danger captés par les TLR de façon à produire et maintenir à long terme des réponses mémoire CD4⁺ VHC-spécifiques, sans quoi de nouvelles réponses CD8⁺ ne peuvent être générées

contre des mutants d'échappement. Ainsi, il apparaît pertinent de replacer les DC comme intermédiaires critiques entre le VHC et la qualité des réponses CD4/CD8 développées.

REMERCIEMENTS

Je remercie tous les membres de notre laboratoire pour les discussions et les idées qui ont nourri cet article, et Dominique Sauvé pour l'avoir relu et corrigé.

ABSTRACT (ANGLAIS)

HCV chronic infection is proving a public health problem of growing importance, affecting to this day 3% of the world's population. The inadequacy and loss of HCV-specific CD4⁺ help is widely perceived as the sole factor responsible for the failure of CD8⁺ cells to afford protection against the highly mutable HCV genome. But the different mechanisms that are operating within the host to result in the failure of the adaptive immunity and allow HCV to establish persistent infection remain elusive. As a general rule, viruses that persist within the host do not behave as inert antigens once they are recognized by actors of the innate immune system such as dendritic cells (DC), which are called upon to interact with T lymphocytes in order to initiate the activation of an acquired response to a foreign antigen. This review discusses the concept that HCV infection of peripheral DC in humans exerts an inhibitory pressure on HCV-specific innate responses. It proposes that DC constitute an immunologically relevant cellular viral host actively targeted by HCV and that this targeting disrupts TLR-dependent signaling pathways in these infected cells to foil innate immunity. The necessity of having functional TLR signaling pathways for full DC activation and generation of T cell memory responses has emerged recently. The loss of TLR-responsiveness in infected DC would represent therefore a specific mechanism to possibly account for the failure of infected subjects to generate and maintain HCV-specific memory responses.

RÉFÉRENCES

1. **Agaugué, S., L. Perrin-Cocon, P. André, and V. Lotteau.** 2007. Hepatitis C lipo-Viro-particle from chronically infected patients interferes with TLR4 signaling in dendritic cell. *PLoS ONE* 2:e330.
2. **Anthony, D. D., N. L. Yonkers, A. B. Post, R. Asaad, F. P. Heinzl, M. M. Lederman, P. V. Lehmann, and H. Valdez.** 2004. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *Journal of Immunology* 172:4907-4916.
3. **Appay, V., P. R. Dunbar, M. Callan, P. Klenerman, G. M. Gillespie, L. Papagno, G. S. Ogg, A. King, F. Lechner, C. A. Spina, S. Little, D. V. Havlir, D. D. Richman, N. Gruener, G. Pape, A. Waters, P. Easterbrook, M. Salio, V. Cerundolo, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones.** 2002. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medecine* 8:379-385.
4. **Auffermann-Gretzinger, S., E. B. Keeffe, and S. Levy.** 2001. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 97:3171-316.
5. **Averill, L., W. M. Lee, and N. J. Karandikar.** 2007. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection. *Clinical Immunology* 123:40-49.
6. **Bain, C., A. Fatmi, F. Zoulim, J. P. Zarski, C. Trepo, and G. Inchauspe.** 2001. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 120:512-524.
7. **Bain, C., and G. Inchauspé.** 2001. Dendritic cells and hepatitis C virus. *Pathologie et Biologie (Paris)* 49:464-465.
8. **Blander, J. M., and R. Medzhitov.** 2006. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440:808-812.
9. **Colonna, M., G. Trinchieri, and Y. J. Liu.** 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology* 5:1219-1226.
10. **Decalf, J., S. Fernandes, R. Longman, M. Ahloulay, F. Audat, F. Lefrerre, C. M. Rice, S. Pol, and M. L. Albert.** 2007. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *Journal of Experimental Medicine* 204:2423-2437.
11. **Della Bella, S., A. Crosignani, A. Riva, P. Presicce, A. Benetti, R. Longhi, M. Podda, and M. L. Villa.** 2007. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4⁺ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology* 121:283-292.
12. **Doyle, S., S. Vaidya, R. O'Connell, H. Dadgostar, P. Dempsey, T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. Haberland, R. Modlin, and G. Cheng.** 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17:251-263.
13. **Dustin, L. B., and C. M. Rice.** 2007. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annual Reviews in Immunology* 25:71-99.
14. **Gautier, G., M. Humbert, F. Deauvieu, M. Sculler, J. Hiscott, E. E. Bates, G. Trinchieri, C. Caux, and P. Garrone.** 2005. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 201:1435-1446.

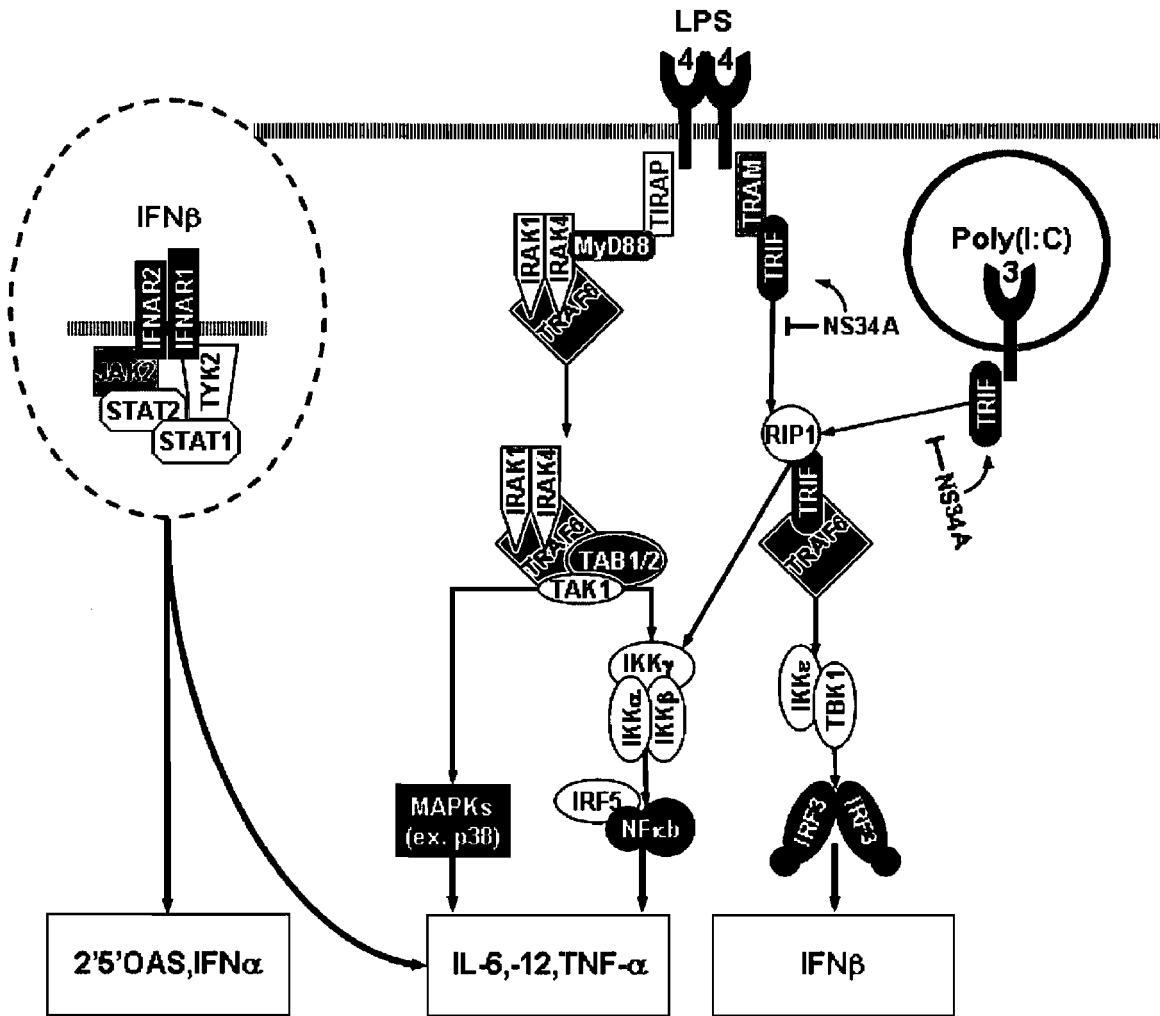
15. Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. Kewal-Ramani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-597.
16. Gerlach, J. T., H. M. Diepolder, M. C. Jung, N. H. Gruener, W. W. Schraut, R. Zachoval, R. Hoffmann, C. A. Schirren, T. Santantonio, and G. R. Pape. 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* **117**:933-941.
17. Goutagny, N., A. Fatmi, V. De Ledinghen, F. Penin, P. Couzigou, G. Inchauspe, and C. Bain. 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Disease* **187**:1951-1958.
18. Grakoui, A., N. H. Shoukry, D. J. Woollard, J. H. Han, H. L. Hanson, J. Ghrayeb, K. K. Murthy, C. M. Rice, and C. M. Walker. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**:659-662.
19. Granelli-Piperno, A., A. Golebiowska, C. Trumfheller, F. P. Siegal, and R. M. Steinman. 2004. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:7669-7674.
20. Granelli-Piperno, A., I. Shimeliovich, M. Pack, C. Trumfheller, and R. M. Steinman. 2006. HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood. *Journal of Immunology* **176**:991-998.
21. Hiasa, Y., N. Horiike, S. M. Akbar, I. Saito, T. Miyamura, Y. Matsuura, and M. Onji. 1998. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* **249**:90-95.
22. Hilleman, M. R. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:14560-14566.
23. Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner. 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**:11416-11421.
24. Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**:743-748.
25. Isaguliants, M. G. 2007. Functionality of the immune system in patients with chronic hepatitis C: trial by superinfections and vaccinations. *Expert Review Vaccines* **6**:527-537.
26. Itano, A. A., and M. K. Jenkins. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology* **4**:733-739.
27. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* **5**:987-995.
28. Kaimori, A., T. Kanto, L. C. Kwang, Y. Komoda, C. Oki, M. Inoue, H. Miyatake, I. Itose, M. Sakakibara, T. Yakushijin, T. Takehara, Y. Matsuura,

- and N. Hayashi. 2004. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* **324**:74-83.
29. Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, T. Tatsumi, N. Kuzushita, A. Ito, Y. Sasaki, A. Kasahara, and M. Hori. 1999. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *Journal of Immunology* **162**:5584-5591.
30. Kanto, T., M. Inoue, H. Miyatake, A. Sato, M. Sakakibara, T. Yakushijin, C. Oki, I. Itose, N. Hiramatsu, T. Takehara, A. Kasahara, and N. Hayashi. 2004. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Disease* **190**:1919-1926.
31. Kobayashi, T., P. T. Walsh, M. C. Walsh, K. M. Speirs, E. Chiffolleau, C. G. King, W. W. Hancock, J. H. Caamano, C. A. Hunter, P. Scott, L. A. Turka, and Y. Choi. 2003. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity* **19**:353-363.
32. Krug, A., R. Veeraswamy, A. Pekosz, O. Kanagawa, E. R. Unanue, M. Colonna, and M. Cella. 2003. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *Journal of Experimental Medicine* **197**:899-906.
33. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology* **1**:398-401.
34. Larsson, M., E. Babcock, A. Grakoui, N. Shoukry, G. Lauer, C. Rice, C. Walker, and N. Bhardwaj. 2004. Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *Journal of Virology* **78**:6151-6161.
35. Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, and S. M. Lemon. 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102**:2992-2997.
36. Longman, R. S., A. H. Talal, I. M. Jacobson, M. L. Albert, and C. M. Rice. 2004. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* **103**:1026-1029.
37. Longman, R. S., A. H. Talal, I. M. Jacobson, C. M. Rice, and M. L. Albert. 2005. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Infectious Disease* **192**:497-503:497-503.
38. Morelli, A. E., and A. W. Thomson. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Review Immunology* **7**:610-621.
39. Navas, M. C., A. Fuchs, E. Schvoerer, A. Bohbot, A. M. Aubertin, and F. Stoll-Keller. 2002. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *Journal of Medical Virology* **67**:152-161.
40. Otsuka, M., N. Kato, M. Moriyama, H. Taniguchi, Y. Wang, N. Dharel, T. Kawabe, and M. Omata. 2005. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* **41**:1004-1012.

41. **Pasare, C., and R. Medzhitov.** 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**:1033-1036.
42. **Pasare, C., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* **21**:733-741.
43. **Pedersen, I. M., G. Cheng, S. Wieland, S. Volinia, C. M. Croce, F. V. Chisari, and M. David.** 2007. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* **449**:919-922.
44. **Piccioli, D., S. Tavarini, S. Nuti, P. Colombatto, M. Brunetto, F. Bonino, P. Ciccorossi, F. Zorat, G. Pozzato, C. Comar, S. Abrignani, and A. Wack.** 2005. Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors. *Journal of Hepatology* **42**:61-67.
45. **Pohlmann, S., J. Zhang, F. Baribaud, Z. Chen, G. J. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R. W. Doms, C. M. Rice, and J. A. McKeating.** 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology* **77**:4070-80.
46. **Rodrigue-Gervais, I. G., L. Jouan, G. Beaulé, D. Sauvé, J. Bruneau, B. Willems, R. P. Sékaly, and D. Lamarre.** 2007. Poly(I:C) and LPS innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in Hepatitis C virus-infected patients. *Journal of Virology* **81**:5537-5546.
47. **Rollier, C., J. A. Drexhage, B. E. Verstrepen, E. J. Verschoor, R. R. Bontrop, G. Koopman, and J. L. Heeney.** 2003. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* **38**:851-858.
48. **Sarobe, P., J. J. Lasarte, N. Casares, A. Lopez-Diaz de Cerio, E. Baixeras, P. Labarga, N. Garcia, F. Borrás-Cuesta, and J. Prieto.** 2002. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *Journal of Virology* **76**:5062-5070.
49. **Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov.** 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunology* **2**:947-950.
50. **Shoukry, N. H., A. G. Cawthon, and C. M. Walker.** 2005. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annual Review of Microbiology* **58**:391-424.
51. **Spörri, R., and C. Reis e Sousa.** 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4(+) T cell populations lacking helper function. *Nature Immunology* **6**:163-170.
52. **Stack, J., I. R. Haga, M. Schroder, N. W. Bartlett, G. Maloney, P. C. Reading, K. A. Fitzgerald, G. L. Smith, and A. G. Bowie.** 2005. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *Journal of Experimental Medicine* **201**:1007-1018.
53. **Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig.** 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Reviews in Immunology* **21**:685-711.
54. **Sun, J. C., and M. J. Bevan.** 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**:339-342.
55. **Takeda, K., and S. Akira.** 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* **16**:3-9.

56. **Tassaneeritthep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich.** 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **197**:823-829.
57. **Trinchieri, G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Review Immunology* **3**:133-146.
58. **Tsubouchi, E., S. M. Akbar, N. Horiike, and M. Onji.** 2004. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Gastroenterology* **39**:754-762.
59. **Tsubouchi, E., S. M. Akbar, H. Murakami, N. Horiike, and M. Onji.** 2004. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Journal of Clinical Experimental Immunology* **137**:417-423.
60. **Wiedmann, M., U. G. Liebert, U. Oesen, H. Porst, M. Wiese, S. Schroeder, U. Halm, J. Mossner, and F. Berr.** 2000. Decreased immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine in chronic hepatitis C. *Hepatology* **31**:230-234.
61. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**:640-643.
62. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology* **4**:1144-1150.

Figure 8. *Voies de signalisation des TLR3 et TLR4.* Ces cascades d'événements signalétiques aboutissent à l'activation des facteurs transcriptionnels NF- κ B et IRF3 qui permettent la transcription des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-12 et TNF- α) et de l'IFN- β respectivement. MyD88 est recruté au niveau du domaine cytosolique TIR du TLR4 et active une cascade de phosphorylation impliquant les kinases IRAK-1/4 qui amplifient le message en s'associant à la E3 ligase TRAF6, menant à l'activation de TAK1 et du complexe NEMO (IKK γ)-IKK α/β (4,348). La finalité de la voie MyD88-dépendante est que I κ B α soit phosphorylé à la Ser³² pour induire sa dégradation par le protéasome, ce qui permet la translocation nucléaire de NF- κ B et la transcription de gènes pro-inflammatoires telles l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le TNF- α , le CCL5 et le CCL3. La voie TRIF-dépendante (partagée par le TLR3 et le TLR4) est spécialisée dans l'expression d'IFN- β par la dimérisation du facteur transcriptionnel IRF3 suite à sa phosphorylation par les kinases TBK1/IKK ϵ . L'expression d'IFN- β est à l'origine d'une boucle autocrine: il se lie à son récepteur IFNAR puis active STAT1 conduisant à l'expression de gènes codant notamment pour les molécules pro-inflammatoires. La NS3/4A protéase du VHC cible protéolytiquement l'adaptateur TRIF en Cys³⁷².



5. Objet de la thèse

Nous avançons l'hypothèse que les MDC (qui expriment le TLR3) sont un hôte viral pour le VHC qui, au lieu d'employer ces cellules comme réservoir de production, interfère activement avec leur capacité à capter des signaux de danger via les PRR connus pour reconnaître le VHC. Cette interférence avec la fonction innée des MDC aurait pour conséquence d'affaiblir la qualité de la mémoire CD8⁺ VHC-spécifique. Or, la caractérisation de tels réservoirs extrahépatiques au sein des DC demeure d'actualité puisque nous ignorons toujours la nature définitive de l'interaction particulière du virus avec les DC circulantes et s'il y a, à proprement dit, établissement d'une interaction physique qui pourrait exercer une conséquence négative sur leurs fonctions. L'implication directe de la présence du génome viral dans l'apparition d'un défaut *in vivo* reste d'ailleurs à démontrer formellement. L'objectif de cette thèse est donc de quantifier et de caractériser moléculairement l'interaction du VHC avec les DC du sang afin de clarifier notre compréhension de leur rôle dans sa persistance chez l'hôte infecté. L'approche expérimentale utilisée a fait appel au qRT-PCR en temps réel, à des antiviraux VHC spécifiques (protéase et polymérase) ainsi qu'à la cytométrie en flux pour démontrer qu'il y a constitution d'un réservoir important au plan immunologique chez les MDC isolées directement de patients chroniquement infectés. Les résultats de ces travaux font l'objet des prochains chapitres.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE 01

CONTEXTE ET PORTÉE

L'article scientifique qui suit fait état des résultats obtenus en lien avec la caractérisation d'un réservoir d'importance immunologique qui se constitue dans les MDC périphériques chez des patients virémiques sans thérapie antivirale. Cet article a été publié en 2007 dans la revue *Journal of Virology* et est reproduit ici avec l'accord des éditeurs de cette revue ainsi que celle des co-auteurs.

Présence de constituants viraux parmi les DC circulantes isolées de patients virémiques.

Pour valider le concept d'un réservoir viral au sein des DC qui perturberait leurs fonctions, nous avons commencé avec la démonstration préalable que les PBMC contiennent de l'ARN du VHC: en utilisant une méthode quantitative de détection de la région 5' conservée du génome viral par RT-PCR en temps réel nous avons détectés des molécules d'ARN génomiques du VHC dans 89% (24/27) des échantillons de PBMC analysés (Tableau 4, données supplémentaires en Annexe). Par la suite, des populations de DC sanguines pures ($\geq 98\%$) ont été isolées à partir des PBMC de patients VHC-séropositifs contenant de l'ARN ($n=X$), mis en culture pour moins de 16 h, triés par cytométrie en tant que compartiment cellulaire CMH-II⁺CD3⁻14⁻19⁻ et analysées par qRT-PCR pour la quantification d'ARN viral afin de déterminer si les DC sont ciblées par le VHC. La détection *ex vivo* d'ARN du VHC dans les DC périphériques (Figure 9 et tableau 4) est conforme aux observations montrant que ce compartiment cellulaire contient sans ambiguïté le virus *in vivo* (11,14). Notamment, nous montrons pour la majorité des patients que les DC contiennent la charge virale intracellulaire la plus élevée (5.07 log₁₀ copies d'ARN par 10⁶ cellules, 4.25-5.80) de toutes les sous-populations analysées (monocytes, B et cellules T). Nous n'avons trouvé aucune corrélation linéaire entre la charge virale (variant de 0.09-5.5 x10⁶ IU/ml) et les niveaux d'ARN viral mesurés par cellule (Tableau 4), ce qui vient confirmer que ce paramètre est indépendant de la virémie (12). Ainsi, la présence des plus hauts niveaux d'ARN du VHC dans les DC relativement à ceux quantifiés dans les échantillons originaux de PBMC ($P<0.001$), soulignent que ces cellules sont l'un des sites d'interaction physique préférentiel du

virus dans la périphérie, avec le potentiel de constituer un hôte cellulaire important si cette interaction devait inhiber l'activation de la réponse innée dans ces mêmes patients virémiques.

Atténuation de la réponse au poly(I:C) et LPS dans les DC de patients virémiques: conséquence de la présence d'ARN génomiques du VHC.

Conséquemment, nous avons tenté de déterminer si l'ARN du VHC détecté exerçait une influence sur la transduction des signaux provenant des récepteurs TLR3 (poly I:C) et TLR4 (LPS) par analyse cytométrique des profils d'expression de multiples cytokines et chémokines (IL-6, IL-12, TNF- α et CCL3) produites par les MDC (CD14⁻33⁺HLA-DR⁺) du sang. Il faut rappeler que TRIF, l'adaptateur TIR utilisé par ces deux TLR, est dégradé par la NS3/4A du VHC dans les réplicons Huh7 (voir chapitre I). Pour ce faire, des échantillons provenant de 14 sujets virémiques et deux sujets avirémiques ont été analysés en parallèle par cytométrie intracellulaire à six couleurs et quantifiés pour leur contenu en ARN viral afin d'établir que la désensibilisation des TLR étudiés est restreinte aux patients virémiques donnant un signal positif en qRT-PCR, correspondant donc à la présence d'ARN viral dans les DC. Les niveaux d'expression d'IL-12 et de TNF- α suivant l'engagement des deux TLR analysés corrèlent significativement avec la détectabilité d'ARN viral dans les DC ($p=0.004$, figure 10A, panneaux de droite). C'est apparent dans le fait que 6/6 patients (P24, P25, P28, P31, P33 et P35) avec des niveaux bas en ARN VHC ($\leq 10^4$ copies) ont montré des profils de cytokine normaux comparativement à 7/7 patients (P06, P20, P23, P27, P29, P30 et P32) dans lesquels les faibles réponses ont été associées à de très hauts niveaux d'ARN ($\geq 10^5$ copies). Par ailleurs, les niveaux d'expression en IL-6 et CCL3 pour les deux sous-groupes cliniques étaient similaires à ceux observés pour les donneurs sains (Figure 10B). L'atténuation de la réponse n'est pas corrélée avec des déficits dans la fréquence des MDC chez ces patients (Figure 13). Pris ensemble, ces données indiquent que des interactions virus-hôte entre le VHC et les DC et la perte de fonction des TLR ne sont pas des phénomènes indépendants. Cela suggère que les DC constituent un hôte viral cellulaire d'une

importance immunologique activement ciblé par le VHC. Toutefois, l'implication de cela dans le maintien de la persistance virale n'est pas claire.

Conclusion

Les données accumulées suggèrent que le VHC exerce des effets inhibiteurs profonds sur le fonctionnement d'un nombre restreint de MDC de patients virémiques (Figure 12), freinant ainsi peut-être le développement de l'immunité adaptative. Cette étude est la première à rapporter une interaction quantitativement importante entre le VHC et les DC du sang, interaction qui soutient activement un mécanisme d'évasion immunitaire qui n'interfère qu'avec les fonctions des cellules ciblées. Nous avons démontré que la perte de l'expression d'IL-12 et de TNF- α suivant l'engagement des TLR3 et TLR4 corrélaient significativement avec les niveaux d'ARN génomique du VHC dans les DC de patients virémiques. Ces résultats montrent qu'il y a un lien entre la réceptivité des MDC à ces ligands TLR et la détection du génome viral, suggérant la possibilité que certains éléments viraux interdisent aux signaux de danger d'être convenablement transmis par la voie TRIF-dépendante des TLR3 et TLR4 dans des MDC ciblés. La NS3/4A serait peut-être impliquée dans le développement de ces défauts puisqu'elle cible protéolytiquement l'adaptateur TRIF en Cys³⁷² (20).

POLY(I:C) AND LPS INNATE SENSING FUNCTIONS OF CIRCULATING HUMAN MYELOID DENDRITIC CELLS ARE AFFECTED *IN VIVO* IN HEPATITIS C VIRUS-INFECTED PATIENTS

Ian Gaël Rodrigue-Gervais^{1,2,3}, Loubna Jouan^{1,5}, Geneviève Beaulé^{1,3}, Dominike Sauvé^{1,3}, Julie Bruneau^{1,4}, Bernard Willems^{1,5}, Rafick-Pierre Sékaly^{1,2,3}, and Daniel Lamarre^{1,2,5,6*}

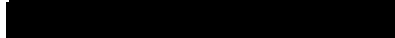
From Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,¹ INSERM U743,² Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1 and Département de Microbiologie et Immunologie,³ Médecine familiale,⁴ Médecine,⁵ and Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie,⁶ Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Running title: DC dysfunctions in HCV infection

Presented in part at the 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montréal, Québec, October 2-6, 2005.

(Publié: J Virol. 2007. **81**(11):5537-46.)

***Corresponding author.** Mailing address: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Saint-Luc, 264 boul. René-Lévesque Est, Rm EA-312, Montréal, Qc, H2X 1P1. Phone: 514-8908000-35258. Fax: 514-4127314. E-mail:



[Abstract: 246 words; Text: 5,110 words]

ABSTRACT

The role of peripheral dendritic cells (DCs) in hepatitis C virus (HCV) infection is unclear. To determine if persistent infection exerts an inhibitory pressure on HCV-specific innate responses, we analyzed DC function in blood through quantification of cell-associated HCV RNA levels in conjunction with multiparametric flow cytometry analysis of pathogen recognition receptor-induced cytokine expression. Independently of the serum viral load, fluorescence-activated cell sorter-purified total DCs had a wide range of cell-associated HCV genomic RNA copy numbers (mean \log_{10} , 5.0 per 10^6 cells; range, 4.3 to 5.8). Here we report that for viremic patients with high viral loads in their total DCs, the myeloid DC (MDC) subset displayed impaired expression of interleukin-12 (IL-12) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) but normal IL-6 or chemokine CCL3 expression in response to poly(I:C) and lipopolysaccharide (LPS). IL-6-expressing cells from this subgroup of viremic patients demonstrated a significant increase (sixfold more) in TNF- α^- IL-12 $^-$ cell frequency compared to healthy donors (mean, 38.8% versus 6.5%; $P < 0.0001$), indicating a functional defect in a subpopulation of cytokine-producing MDCs (~6% of MDCs). Attenuation of poly(I:C) and LPS innate sensing was HCV RNA density dependent and did not correlate with viremia or deficits in circulating MDC frequencies in HCV-infected patients. Monocytes from these patients were functionally intact, responding normally on a per-cell basis following stimulation, independent of cell-associated HCV RNA levels. Taken together, these data indicate that detection of HCV genomic RNA in DCs and loss of function in the danger signal responsiveness of a small proportion of DCs *in vivo* are interrelated rather than independent phenomena.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) chronic infectious disease is proving to be a public health problem of growing importance. The inadequacy and loss of HCV-specific CD4 $^+$ T-cell help are widely perceived as the principal factors responsible for the failure of CD8 $^+$ T cells to afford protection against the highly mutable HCV genome (13, 41). Nonetheless, the precise mechanisms operating within the host which result in the failure of CD4 $^+$ T-cell immunity and allow HCV to establish persistent infection have

remained enigmatic (38). In this regard, the role of CD11c^{hi} myeloid dendritic cells (MDCs) is of interest because these peripheral antigen-presenting cells display extraordinary capacities to link innate and adaptive immunity (18). Indeed, diphtheria toxin-based *in vivo* depletion of CD11c⁺ DCs abrogates priming of T cells in response to infectious pathogens in otherwise immunocompetent mice (19). Despite careful execution of experiments, the exact contribution of MDCs to any individual aspect of HCV immunity remains controversial.

It has been reported that CD4⁺ T-cell activation (allogeneic responses) is decreased in HCV-viremic patients (3, 21, 42). This is corrected upon clearance of cell-associated viral RNA from MDCs after 4 weeks of ribavirin/alpha interferon (IFN- α) antiviral therapy (43), indicating that weak HCV-specific CD4⁺ T-cell responses are perhaps due to defects in DC-mediated innate immune functions. In contrast, other observations (26) have been taken to indicate that the deficiency in HCV-specific CD4⁺ T-cell activity is not attributable to virus-induced dysfunctions in these cells or their precursors (DC independent), even though DC-derived signals may be essential for the T-cell activation function itself. Accordingly, the use of *in vitro* cytokine-driven culture systems for chronic infection is reported to result in functionally intact CD14⁺ monocyte-derived DCs (albeit to various degrees in different studies) (24, 26, 32, 35). However, it has remained equally likely that the DC population in question was generated from nondefective precursors in the *in vitro* system, as these studies demonstrated the potential for functional DC development from monocytes rather than the existence of functional DC subsets in the periphery. The seemingly paradoxical conclusions drawn from those observations highlight the importance of carrying out functional measurements on cells with minimal manipulation. Most of the relevant studies presumed an equivalent function of the peripheral counterparts, a hypothesis supported by data showing that tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-activated MDCs from viremic patients are functionally competent, with a CD4⁺ T-cell clonal expansion capacity equal to that of healthy donors (27). While that finding indicates that TNF receptor signaling is not affected in peripheral MDCs, the extent

of activation of these cells in response to multiple innate inputs known to relay distinct danger signals (e.g., Toll-like receptors [TLRs]) remained unexplored.

In vivo, the requirement that DCs directly recognize a pathogen-specific molecule to effectively induce the efferent functions of helper CD4⁺ T cells after activation cannot be replaced by inflammatory cytokines (e.g., TNF- α) (39). TLR3, -7, and -8 expressed on MDCs act principally as viral sensors, recognizing, in a replication-independent way, conserved molecular motifs in virus genomic RNA (1, 14, 23). The signals that originate from these TLR sensors are those required to drive antigen-specific CD4⁺ T-helper-cell differentiation *in vivo* (31, 36, 37, 45). Recently, one study reported that reduced TLR3-induced interleukin-12 (IL-12) production correlated with lower frequencies of HCV-specific CD4⁺ T-cell help in viremic patients (2). Notably, HCV NS3/4A serine protease can function as an antagonist of TLR3-dependent innate sensing through its ability to specifically target its signaling adaptor, TRIF, for proteolytic cleavage (25). Inhibition of this protease activity enables host recognition of HCV RNA (9, 40). Loss of TLR3 sensing, as reported by Anthony et al. (2), may therefore relate to the ability of HCV to physically interact with MDCs and cause disruptions of TLR-mediated innate recognition of HCV components in these cells. However, *in vivo* data substantiating this view are scarce, as the function of TLRs in innate immunity with respect to HCV has not been studied extensively.

For this study, we took advantage of a sensitive and precise multiparametric flow cytometry assay based on the induction of intracellular cytokines after very short-term (6-hour) stimulation of Golgi transport-inhibited DCs with TLR agonists and readdressed the question of whether innate functions of MDCs are intact in HCV-positive subjects. We report the attenuation of poly(I:C) (TLR3) and lipopolysaccharide (LPS) (TLR4) innate sensing potential in a small proportion of CD14⁻ CD33⁺ major histocompatibility complex class II-bright (MHC-II^{br}) cytokine-producing MDCs from viremic patients, as long as the total DCs in those patients contained high levels of cell-associated HCV genomic RNA ($\geq 5.0 \log_{10}$ copies per 10^6 cells). These results provide the first clear evidence of an association between

HCV and a loss of function of the danger signal responsiveness of MDCs in the presence of ongoing viremia.

(This work was carried out as partial fulfillment of I.G. Rodrigue-Gervais' Ph.D. thesis at the Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.)

MATERIALS AND METHODS

Patients and control individuals. Blood samples were obtained from 18 HCV-infected patients enrolled in the drug addiction cohort and the hepatology experimental unit of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Hôpital Saint-Luc. The clinical and demographic characteristics of the patients studied are shown in Table 4. Antiviral therapy had been discontinued at least 1 year prior to sample collection. Clinical protocols conformed to the ethical guidelines of our institutions. Samples were obtained with the informed consent of the subjects.

Primary cell isolation, cell culture, and cell stimulation. Peripheral blood was collected in heparin preparation tubes (Vacutainer; Becton Dickinson, Franklin, NJ). Fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation, and cultures were performed as described previously (15). In brief, PBMCs were seeded in 75-cm² culture flasks at a concentration of 10×10^6 cells per ml, cultured at 37°C with 5% CO₂, and used within 12 to 16 h of isolation for all stimulations and sorting experiments. PBMCs were stained with directly conjugated anti-CD19-fluorescein isothiocyanate (anti-CD19-FITC) (HIB19), anti-HLA-DR-peridinin chlorophyll protein (PerCP) (L243; MHC-II), anti-CD3-allophycocyanin (anti-CD3-APC) (UCHT1), and anti-CD14-APC-Cy7 (M ϕ P9) cell surface antibodies from BD Pharmingen and then sorted. In cell sorting experiments, about 1×10^5 blood CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ MHC-II⁺ DCs were sorted from 1×10^8 cells on a FACS Aria flow cytometer, using DiVa v4.0 software (Beckton Dickinson, La Jolla, CA). Subpopulation purity was always above 99%. For cytokine production experiments, cells were stimulated for 6 h at 37°C in 96-well U-bottomed deep-well plates (1.25×10^6 cells per well) with either 0.1 μ g/ml LPS (*Escherichia coli* O55:B5; Sigma-Aldrich) or 25 μ g/ml poly(I:C) (Amerhsam Biosciences) (final

concentrations), and the secretion inhibitor brefeldin A (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich) was added for intracellular cytokine detection in the last 5 h of stimulation. Control conditions included the absence of agonists (medium alone) to control for spontaneous, non-agonist-specific cytokine synthesis. In some experiments, healthy donor PBMCs were stimulated in the presence of SB202190 (10 μ M) to impose a blockade of p38 mitogen-activated protein kinase activity (see Fig. 10).

Flow cytometry. Surface and intracellular staining was done using directly conjugated antibodies and Cascade Yellow-streptavidin (Molecular Probes) according to standard techniques. The following antibodies were used: anti-CD3-phycoerythrin-Cy7 (anti-CD3-PE-Cy7) (SK7), anti-CD4-APC-Cy7 (RPAT4), anti-CD11c-APC (B-ly6), anti-CD14-FITC (M5E2), anti-CD14-PE (M5E2), anti-CD16-FITC (3G8), anti-CD19-PE-Cy7 (SJ25C1), anti-CD33-PerCP-Cy5.5 (P67.6), anti-CD123-PE-Cy5.5 (9F5), anti-HLA-DR-biotin (L243), anti-HLA-DR-APC-Cy7 (L243), anti-IL-6-PE (MQ2-6A3), anti-CCL3-PE (11A3), anti-IL-12 p40/70-APC (C11.5), anti-TNF- α -PE-Cy7 (MAb11) (all from BD Pharmingen), anti-CD62L-phycoerythrin Texas Red (ECD) (DREG56) (Immunotech), and anti-CD303-FITC (AC144) (Miltenyi Biotec). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) data were acquired on an LSRII flow cytometer, using FACS DiVa v4.0 software. A minimum of 1×10^6 events in the live-cell gate, as defined by forward and side scatter, were accumulated for each sample, in duplicate. MDCs appear as a uniform cluster of CD33⁺ CD14⁻ HLA-DR (MHC-II)^{br} cells, allowing them to be distinguished from monocytes and lymphocytes. Responses to stimuli were considered positive if the frequency of IL-6 cytokine-producing MDCs was three or more times the frequency in medium alone. Cytokine clustering analysis was done as described previously (17) by inputting the log₂ ratio of mean fluorescence intensity (MFI) values for intracellular FACS staining positive events ($\text{MFI}^{\text{stimulated}}/\text{MFI}^{\text{unstimulated}}$) into MeV array software (<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>). For these clustering analyses, protein expression in the CD14⁻ CD33⁺ MHC-II^{br} MDC population from HCV patients treated with stimuli was presented as the log₂ change versus protein expression in the MDC population from healthy donors.

HCV RNA quantification. Primers specific for the 5'-untranslated region of HCV and the human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene (Table 5) were defined for the strain H77 and human sequences (GenBank accession numbers AF011751 and BC020308, respectively). The amplicon for HCV, defined by the HCV 5'/3'-out primers and amplified from the p90/HCV FL-long plasmid, was cloned into the pCR2.1 Topo vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) together with the GAPDH amplification product (amplified from human lymphocyte RNA by using the GAPDH 3'/5'-out primer pair). This plasmid was used to generate standard curves for a real-time quantitative PCR-based assay. Quantification was performed with LightCycler hybridization probe technology (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ). Cellular RNAs were extracted using RNeasy Mini columns (QIAGEN, Valencia, CA) per the manufacturer's instructions and were reverse transcribed for 30 min using Omniscript reverse transcriptase (QIAGEN). After reverse transcription (RT), PCR amplification was performed (5 min of initial denaturation at 95°C, followed by 45 s at 94°C, 60 s at 60°C, and 2 min at 72°C for 20 cycles) using the outer 3'/5' primer pairs. The linearity of this first-round assay was demonstrated in duplicate experiments of up to 20 cycles, using a maximum of 1 µg of Huh7 clone 9-13 replicon RNA (unpublished data). These PCR conditions were used for all subsequent experiments. PCR conditions in the LightCycler experiments, performed with 1/10 of the initial PCR product, were as follows: 60 s of initial denaturation at 95°C, followed by 1 s at 95°C, 10 s at 60°C, and 15 s at 72°C for 40 cycles. Fluorescence measurements were performed at the end of the annealing steps. An HCV RNA replicon calibrator synthesized from plasmid pHCVrepAB12 with a T7-Megascript *in vitro* transcription kit (Ambion, Austin, TX) was used in all experimental runs. This highly sensitive nested quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assay allows the detection of ≥ 100 HCV sense-strand copies per 10^6 cells. HCV was quantified in duplicate at the RT level for all studied samples. Healthy blood donors routinely tested in all experimental runs failed to give detectable signals for HCV RNA.

Statistics. Statistical analysis was performed using the Vassar website (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>) and the GraphPad Prism v3.0

statistical software package. All tests were two-tailed, and P values of <0.05 were considered significant.

RESULTS

Circulating total DCs from viremic patients contain genomic viral RNAs. In trying to relate virus-induced loss of function with anomalies in innate sensing pathways of peripheral DCs, we first explored the nature of the immune subsets that interact with HCV and act as potential targets for this virus *in vivo*. PBMCs with measurable HCV RNA from viremic patients were sorted into T cells, B cells, monocytes, and total DCs by four-color flow cytometry ($n = 9$) and subjected to a real-time qRT-PCR assay (≥ 100 copies/ 10^6 cells) that allowed for accurate quantification of sense-strand HCV RNA molecules in peripheral leukocytes from infected patients (Fig. 9). Quantification of cell-associated viral RNA loads in sorted leukocytes confirmed that HCV genomic RNA is detectable within CD19⁺ B lymphocytes (mean \log_{10} value, 4.7 per 10^6 cells; range, 3.6 to 5.5). We found a significantly lower HCV RNA level in peripheral CD3⁺ T cells than in all other peripheral subpopulations analyzed (one-way analysis of variance [ANOVA]; $P < 0.0001$), supporting the notion that T cells do not constitute a preferential viral interaction partner *in vivo*. Detection of viral RNA in peripheral DCs was consistent with other findings showing that this cellular compartment unambiguously interacts with HCV (12, 42, 43). Surprisingly, however, CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ MHC-II⁺ total DCs had high cell-associated viral loads (mean \log_{10} value, 5.2 per 10^6 cells; range, 4.4 to 5.8). In contrast to the case in a previous study (5), CD14⁺ monocytes were unusually positive for HCV RNA (mean \log_{10} value, 4.6 per 10^6 cells; range, 4.1 to 5.4), with levels very similar to those of B cells but significantly lower than those of total DCs in a pairwise comparison (Student's correlated t test; $P = 0.005$). No correlation existed between the serum viral load (ranging from 4.9 to 6.7 \log_{10} IU ml⁻¹) (Table 4) and HCV genomic RNA level per cell in FACS-examined total DCs or monocytes (data not shown), arguing against passive plasma viral particle adsorption into mononuclear blood phagocytes as the source of the detected viral RNA. Consequently, we have used the quantitative detection of genomic HCV RNA as a

reliable surrogate marker of a specific interaction between the virus and DCs, not as one of actual infection, in the following experiments. The consistent presence of genomic HCV RNA and its high content within total DCs indicate that these cells are targets of HCV in the periphery, with the potential to constitute an immunologically relevant host if this interaction was associated with dampened activation of the innate immune response in viremic patients.

MDCs display impaired expression of IL-12 and TNF- α , but not IL-6 or CCL3, in response to poly(I:C) and LPS in viremic patients. Next, we tested the hypothesis that the association of HCV with DCs *in vivo* would lead these cells to react to poly(I:C) and LPS in an inappropriate or sensitized manner in HCV-viremic patients and would be related to disease progression. PBMC samples from 14 HCV-viremic and 2 aviremic clinical responders ($n = 16$) were used to survey, by intracellular flow cytometry, the innate sensing potentials of MDCs and monocytes by exposing cells to stimuli and measuring downstream cytokine signatures at the single-cell level. We computed FACS cytokine expression levels [$\log_2(\text{MFI}^{\text{stimulated}}/\text{MFI}^{\text{unstimulated}})$] and built a heat map indicating the \log_2 changes in IL-6, IL-12, TNF- α , and CCL3 protein expression profiles for CD14⁻ CD33⁺ MHC-II^{br} patient MDCs treated with poly(I:C) or LPS versus protein expression in the MDC population from age-matched healthy donors ($n = 7$) (Fig. 10A). Each square in the grid represents, in a color gradient, the expression of one intracellular marker (as measured by the MFI) in response to one stimulus for each patient. Surprisingly, we observed differences in the strengths of the MDC responses between viremic patients after stimulation. As an example, although patients HCV-P28 and HCV-P29 are both viremic nonresponders (Table 4), their MDCs exhibited very different cytokine induction patterns following poly(I:C) and LPS stimulation (Fig. 10A). To understand this dichotomy in responses between viremic patients, we grouped them with unsupervised hierarchical clustering algorithms used in microarray gene expression analysis (as described in Materials and Methods). This approach enabled the investigation of whether the patients with response anomalies showed functional similarities to each other and differed from those with normal responses. By using a

cluster analysis, we identified two main groups of viremic patients with key differences in their poly(I:C)- and LPS-induced cytokine expression profiles (Fig. 10A). Each was termed a distinct cytokine profile (CP) cluster based on the primary nature of the response potential of the cluster. CP-defective (CP-D) patients (8 of 16 patients) displayed less cytokine (IL-12 and TNF- α) expression in response to agonist stimulation than did healthy donors. CP-normal (CP-N) patients (8 of 16 patients) displayed a response potential similar to that of healthy donors. Both IL-12 and TNF- α expression was significantly decreased in CP-D patients compared to that in age-matched healthy donors and CP-N patients (Fig. 10B), indicating that the expression of these two cytokines is jointly affected in viremic patients. Interestingly, IL-6 and chemokine CCL3 expression levels were not observed to differ in patient subgroups relative to healthy donors and each other (Fig. 10A and B). Notably, aviremic subjects SR-P31 and SVR-P35 exhibited normal cytokine expression and clustered within the CP-N group.

Attenuation of innate sensing in MDCs is associated with high HCV RNA abundance in total DCs. The picture that emerges from the unsupervised cluster analysis reveals a role for a virus-dependent loss of function as the cause of the innate sensing dysfunction in MDCs. This is apparent in that 6/9 patients (HCV-P24, -P25, -P33, and -P34, SR-P31, and SVR-P35) with low levels of HCV RNA in PBMCs ($<10^4$ copies) showed normal poly(I:C)- and LPS-potentiated expression profiles, in contrast to 5/6 patients (HCV-P23, -P26, -P29, -P30, and -P32) for whom poor responses were associated with high cell-associated HCV RNA levels in PBMCs ($\geq 10^4$ copies) and a CP-D clustering (Fig. 10A, black bars). Similarly, CP-D patients had high levels of HCV RNA in total DCs ($\geq 10^5$ copies; 6/7 patients) compared to CP-N patients ($<10^5$ copies; 6/6 patients) (Fig. 10A, white bars, and Table 4). These results demonstrate that in most cases, inhibition of cytokine expression is linked to the level of viral RNA in carrier cells. In fact, Fisher's exact probability test indicated that attenuation of poly(I:C)- and LPS-induced cytokine up-regulation was not independent of the level of HCV RNA copy abundance in total DCs ($P = 0.004$) (Fig. 10A, right panel). Thus, for every CP-D subject, whether naive or a nonresponder,

DCs had a 3 to 23 times (mean, 10-fold) higher cell-associated virus content than that in CP-N patients. Furthermore, the abundance of viral RNA quantified in total FACS-examined DCs negatively correlated with poly(I:C)- and LPS-mediated induction of IL-12 and TNF- α in MDCs ($P = 0.0028$ and $P = 0.0003$, respectively) (Fig. 11). Finally, since CP-D patients did not have higher levels of viremia than CP-N patients (mean \log_{10} value, 6.1 ± 0.5 and 6.3 ± 0.5 , respectively; $P = 0.37$ by Student's t test) (Table 4), it is unlikely that this defect was due to nonspecific plasma viral particle adsorption. Thus, our findings support the idea that emergence of defective MDCs in the periphery is a result of virus-induced dysfunctions rather than the sole consequence of exposure of MDCs to chronic viral disease, as proposed previously (35). They also demonstrate that the cell-associated HCV RNA load in DCs is predictive of TLR responsiveness independent of viremia: DCs containing increasing amounts of HCV RNA are more functionally exhausted in that they are less able to respond to danger stimuli *ex vivo*. Altogether, these data provide evidence that HCV can specifically attenuate danger signal activation of innate immune functions of blood MDCs in viremic patients.

Selective attenuation of poly(I:C) and LPS innate sensing in a subpopulation of MDCs in viremic patients. The higher levels of HCV RNA in CP-D patients could be due to a large number of copies in a small number of cells or to a small number of copies in nearly all DCs (of which ~50% are MDCs). To reconcile the apparent low HCV RNA copy number per DC with the functional defects observed in MDCs (which until now were shown as an absolute level of cytokine expression for the whole MDC population), we analyzed the patterns of IL-12 and TNF- α production at the single-cell level to demonstrate that only a small proportion of the MDC population from these patients is nonfunctional for cytokine production. All patients analyzed consistently displayed approximately equivalent levels of IL-6 expression per cell (Fig. 10B, bottom panel), demonstrating that induction of IL-6 was not inhibited by HCV. In conjunction with the finding that essentially all TNF- α^+ IL-12 $^-$, TNF- α^- IL-12 $^+$, and TNF- α^+ IL-12 $^+$ MDCs expressed IL-6 in healthy donors (data not shown), these observations indicated that IL-6 acts as a key molecular marker of cells

activated to produce cytokines (TNF- α and IL-12), making this a traceable subset in defective patients, and that such an analysis should not lead to missed HCV-caused MDC dysfunctions.

Direct *ex vivo* analysis of CD14⁻ CD33⁺ MHC-II^{br} IL-6⁺ MDC responsiveness to poly(I:C) and LPS revealed striking differences at the single-cell level for the patients tested that confirmed the MFI results shown in Fig. 10. Figure 12 illustrates these different patterns in two-dimensional contour plots of the expression of IL-12 and TNF- α for two representative patients after gating on IL-6⁺ MDCs (~30% of MDCs). Similar to the case for healthy donors, poly(I:C) and LPS stimulated both high IL-12 and TNF- α expression in MDCs from patient HCV-P28 (CP-N), and high dual production took place simultaneously in individual cells (Fig. 12, bottom row). Conversely, patient HCV-P29 (CP-D) demonstrated a loss of cytokine-secreting effectors with both agonists (13.5-fold more TNF- α ⁻ IL-12⁻ cells than those of patient HCV-P28). This resulted in a lower expression output at the single-cell level, as indicated by the diminished fluorescence intensity shift in both intracellular cytokines (Fig. 12A, gray arrows). This observation applied to the majority of the patients: CP-D patients exhibited sixfold higher frequencies of TNF- α ⁻ IL-12⁻ cells than did CP-N patients (38.8% versus 6.5%; $P < 0.0001$ by Mann-Whitney U test) (Fig. 12C). This increase in doubly negative effectors paralleled a significant decrease in TNF- α ⁺ IL-12⁺ cell frequency (fourfold less) in the CP-D subgroup compared to that for CP-N patients (mean, 6.3% versus 25.7%; $P = 0.0003$) (Fig. 12C), indicating that a subpopulation of cytokine-producing MDCs (~6% of MDCs) in the CP-D subgroup of patients expressed abnormal levels of TNF- α and IL-12 following poly(I:C) or LPS stimulation. In contrast, LPS-activated CD14⁺ CD33⁺ MHC-II⁺ IL-6⁺ monocytes had essentially identical expression of TNF- α and IL-12 on a per-cell basis for all patients analyzed (Fig. 12A, rightmost panels, and data not shown), challenging the idea that nonspecific interactions with HCV or TLR-mediated chronic stimulation *in vivo* (7) is the underlying cause for the loss of function in the responsiveness of the MDCs. Thus, defective production of cytokines at the single-cell level is confined to a small population of responding MDCs (~3% of total DCs, defined as IL-6⁺), appears

to be cell type specific, and is a selective process restricted among viremic patients (Fig. 10). Furthermore, this analysis highlights that limited functionality is observed in only 6% of MDCs and is not a generalized characteristic of all MDCs in affected viremic patients.

Variability in MDC frequency does not account for loss of function of poly(I:C) and LPS innate sensing in the IL-6⁺ subset. As mentioned above, a subpopulation of activated MDCs (IL-6⁺) from viremic patients responded less strongly to the agonists tested, expressing smaller amounts of TNF- α and IL-12 on a per-cell basis. A close look at Fig. 12A (top row) shows that patient HCV-P29 had a reduced frequency of IL-6-positive cells (half that of patient P28), hinting at the involvement of population heterogeneity (i.e., disappearance of circulating MDCs) (Table 4) as a further cause of the differential response outcome. The absence of a small population of CD14⁻ CD33⁺ MHC-II^{br} IL-6⁺ cells with the brightest intensities of TNF- α and IL-12 staining might be accounted for by the numerical disappearance of the cytokine-producing cells from the periphery rather than their inability to synthesize normal levels at the single-cell level (intrinsic defect). To address this issue, we enumerated DC subsets in blood, using 10 immunophenotypic surface markers simultaneously with eight-color flow cytometry (Fig. 13). Consistent with other reports (19, 26), we found that HCV-infected patients had 1.7-fold lower frequencies of circulating MDCs than did healthy donors (mean, 0.24% \pm 0.03% and 0.40% \pm 0.03%, respectively; P = 0.001 by Mann-Whitney U test) (Fig. 13C). Lower frequencies (2.4-fold) of plasmacytoid DCs (PDCs) also characterized the same patients (mean, 0.09% \pm 0.01% and 0.22% \pm 0.02% for patients and healthy controls, respectively; P < 0.0001) (Fig. 13C). These results demonstrate that frequencies of circulating DC subsets are decreased during HCV infection. However, an absence of relationship was observed between MDC frequencies and cytokine production at the single-cell level in response to either agonist (Fig. 13D and E). The absence of correlation reflects the fact that some patients with relatively high MDC counts in blood had weak poly(I:C) and LPS responses, as in the case of HCV-P06 (0.33%), whereas some patients with normal functions had some of the lowest MDC frequencies (e.g., patient P33, with a

frequency of 0.17%) (see Table 4 and Fig. 10 for functional profiles). Thus, the patients with the lowest frequencies were not necessarily the patients with defects in cytokine expression, and consequently, we can eliminate the variability arising from intersubject differences in MDC subset frequencies as an alternative explanation, or even a contributing factor, to virus-dependent single-cell intrinsic defects. This finding further supports the concept that virus-induced interference with innate functions *in vivo* affects the capacity of a small population of blood MDCs of viremic patients to adequately respond to activating danger signals.

DISCUSSION

There is a lack of consensus behind the concept of virus-induced impairment of DC function during chronic HCV infection. In previous work, monocytes were isolated from HCV-infected individuals and differentiated into DCs during a 1-week culture period with high doses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-4, which likely enhanced antigen-presenting cell capacity and overcame any immunologic defect in DCs present *in vivo*. In contrast, we have mapped danger signal inhibition in the CD14⁻ CD33⁺ MHC-II^{br} MDC blood subset within individual patient samples by clustering patients based on poly(I:C)- and LPS-mediated cytokine up-regulation outcomes. By comparing two similarly viremic groups with distinct functional outcomes, we discovered that responses to stimuli were significantly linked to the abundance of HCV genomic RNA in FACS-purified total DCs for a subgroup of patients (cluster CP-D) and did not correlate with either viremia or deficits in circulating MDC frequencies for HCV-infected patients. The results presented herein confirm the presence of impaired MDCs in some viremic subjects (2, 4, 29) and demonstrate that overall frequencies of nonfunctional cytokine-producing MDCs are considerably small (<3% of overall DCs in blood), indicating the absence of global defects in innate recognition of danger signals by DCs. The activities measured here are more likely to reflect the complex interactions that occur *in vivo*. For example, most studies have shown that it is possible to engineer phenotypically and functionally intact monocyte precursor-derived DCs from chronically infected

individuals (24, 26, 32), and in keeping with this, we found that monocytes from these patients were functionally intact.

Collectively, these data indicate that detection of HCV genomic RNA in DCs and loss of function in the danger signal responsiveness of a small population of MDCs *in vivo* are interrelated rather than independent phenomena. Clearance of cell-associated viral RNA from MDCs of HCV-infected patients after 4 weeks of ribavirin/IFN- α antiviral therapy was reported to restore their CD4⁺ T-cell activation potential (43). Due to practical limitations, HCV qRT-PCR analysis could be performed exclusively with purified bulk DCs, not MDCs, in our study. As a consequence, the dynamics of HCV copy numbers in blood DCs and the interplay with functional impairment of pathogen recognition receptor innate sensing responses are highly tempered because of the presence of a large (and variable) fraction of cells not expected to be defective (27) or harboring HCV RNA (20). Furthermore, the fraction of impaired MDCs (defined as IL-6⁺ TNF- α ⁻ IL-12⁻) accounts for <3% of total DCs in blood; this could explain the apparent low HCV RNA copy number per DC. Thus, even if it is impossible to pinpoint the exact levels of HCV RNA in MDCs in the current study, we estimate that there are between 3 and 20 HCV RNA molecules per cell, assuming segregation of HCV to MDCs nonfunctional for cytokine production (30 of 1,000 overall DCs in blood are defective). Clearly, a continued understanding of HCV-DC dynamics in viremic patients should allow for important insight into how DCs harboring increasing amounts of HCV RNA become functionally exhausted.

Although the molecular basis by which MDCs become unresponsive to danger stimuli in HCV infection is currently unclear, attenuation of the DC cytokine synthesis potential may be considered in the context of previous literature demonstrating that HCV is remarkably proficient at antagonizing poly(I:C)-activated signaling through direct inactivation of events proximal to the TLR3 pathway (reviewed in reference 10). TRIF, a signal bridging adapter for both TLR3 and TLR4, is a known proteolytic substrate of HCV NS3/4A protease (25), and *Trif*^{-/-} DCs (16, 22, 44) show defective production of both IL-12 and TNF- α , but not IL-6, in response to poly(I:C) and LPS (TLR4). Considering that a 1,000- to 10,000-fold excess of viral proteins relative to

positive-strand RNA is observed with full-length HCV replicon cell clones (34), it is tempting to speculate that even the presence of a few viral genomes per DC may be sufficient to produce concentrations of viral proteins required to effectively interfere with innate defense functions at the single-cell level without the need for productive infection (replication). The HCV RNA density-dependent defect in cytokine production (Fig. 10 and 11) represents an empirical basis consistent with such a hypothesis. However, since we have no evidence in this study for infection and/or NS3/4A expression in DCs, the possibility that chronic infection in some individuals induces an impaired DC response independent of direct virus-DC interaction cannot be excluded. Nonetheless, the ability of NS3/4A to interfere with TRIF-coupled danger signal processing provides a plausible mechanism by which HCV could exert its negative effect on poly(I:C)- and LPS-activated cytokine production in DCs. Whether such interference indeed occurs has yet to be established.

Recent studies have shown that HCV-like particles pseudotyped with functional E1/E2 envelope proteins bind to DCs through C-type lectins (20, 28, 33). Evidence for selective inhibition of LPS-induced IL-12 and TNF- α production by cross-linking of C-type lectin receptors expressed on MDCs has been provided for CD206 (mannose receptor) (30), CD209 (DC-SIGN) (11), and DCAL-2 (8). Hence, in the absence of direct infection, cross-linking of C-type lectins by HCV glycoproteins as a result of a quantitative virion binding effect at the cell surface could lead to inactivation of TLR3 and TLR4 innate sensing functions of MDCs in chronic infection. Genetic distinctions in HCV variants between viremic patients are also likely to impart differential levels of control and activation of these TLR-dependent pathways in DCs to evade the host's innate response to infection (10). In this context, one of the reasons that defects in DC function extending into the chronic phase of infection are not always clinically evident may be due to the lack of an effective immune response exerting selective pressure for change in the genetic makeup of HCV quasispecies. This would explain the observation that danger responsiveness is not perturbed in MDCs of CP-N patients with persistent infection. Identification at the molecular level of the mechanisms that lead to HCV-induced DC dysfunction will help to resolve the relative contributions of these evasion strategies in reducing innate

activation potential as well as to determine whether the variations among different subjects are related to viral pathogenicity.

In any event, virus-induced defects in MDC innate sensing may represent an evolutionary adaptation that favors (with other factors) persistent infection in an otherwise immunocompetent host and prolonged host-parasite coexistence. Most circulating MDCs are unlikely to present HCV antigens; any MDCs that present HCV antigens will most likely have been in contact with pathogen components and therefore will have been particularly susceptible to an attack on innate immune sensing mechanisms essential for their effective antigen presentation to T cells (31, 39). This cell-specific and numerically restrained MDC defect offers a promising field of investigation with which to study and understand the HCV-restricted nature of the deficit in cellular immunity (38). Our observations lend empirical support to a currently working model in which virus-induced impairment of DC-mediated innate immunity would participate in the failure of HCV-specific CD4⁺ T-cell help (6); in this model, maintenance of help would be contingent on proper processing and delivery of danger signals by DCs presenting HCV antigens.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Canadian Institute of Health Research grant MOP-79546 (D.L.), a Université de Montréal Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research chairmanship (D.L.), an INSERM U743 doctoral scholarship (I.G.R.-G.), and a Canadian Liver Foundation doctoral scholarship (L.J.).

We thank C. Rice for the p90/HCV FL-long plasmid, C. Richardson for the pHCVrepAB12 plasmid, R. Bartenschlager for providing replicons, L. Montcalm for blood sample collection, D. Murphy for viremia quantification, and A. Lamarre and N. Shoukry for critical reviews of the manuscript. We are indebted to the patients for participating in the study and to P. Melançon, H. Rigsby, M. Lainesse, S. Reis, and J. Reis for technical assistance.

REFERENCES

1. **Alexopoulou L., A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* **413**:732-738.
2. **Anthony D.D., N.L. Yonkers, A.B. Post, R. Asaad, F.P. Heinzl, M.M. Lederman, P.V. Lehmann, and H. Valdez.** 2004. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol.* **172**:4907-4916.
3. **Auffermann-Gretzinger S., E.B. Keeffe and S. Levy.** 2001. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood.* **97**:3171-3176.
4. **Averill L., W.M. Lee and N.J. Karandikar.** 2007. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection. *Clin Immunol.* **123**:40-49.
5. **Boisvert J., X.S. He, R. Cheung, E.B. Keeffe, T. Wright, and H.B. Greenberg.** 2001. Quantitative analysis of hepatitis C virus in peripheral blood and liver: replication detected only in liver. *J Infect Dis.* **184**:827-835.
6. **Bowen D.G., and C.M. Walker.** 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* **436**:946-952.
7. **Brenchley J.M., D.A. Price, T.W. Schacker, T.E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B.R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J.N. Martin F.M Hecht, L.J. Picker, M.M. Lederman, S.G. Deeks and D.C. Douek.** 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* **12**:1365-71.
8. **Chen C.H., H. Floyd, N.E. Olson, D. Magaletti, C. Li, K. Draves and E.A. Clark.** 2006. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood.* **107**:1459-67.
9. **Foy E., K. Li, C. Wang, R. Sumpter, M. Ikeda, S.M. Lemon, and M. Gale.** 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science.* **300**:1145-1148.
10. **Gale M. and E.M. Foy.** 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature.* **436**:939-45.
11. **Geijtenbeek T.B., S.J. Van Vliet, E.A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C.M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk, and Y. Van Kooyk.** 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* **197**:7-17.
12. **Goutagny N., A. Fatmi, V. De Ledinghen, F. Penin, P. Couzigou, G. Inchauspe, and C. Bain.** 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* **187**:1951-1958.
13. **Grakoui A., N.H. Shoukry, D.J. Woollard, J.H. Han, H.L. Hanson, J. Ghayeb, K.K. Murthy, C.M. Rice, and C.M. Walker.** 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* **302**:659-662.
14. **Heil F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer.** 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* **303**:1526-29.
15. **Ho C.S., D. Munster, C.M. Pyke, D.N. Hart, and J.A. Lopez.** 2002. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood.* **99**:2897-2904.
16. **Hoebe K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S.O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, B. Beutler.** 2003.

- Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*. **424**:743-8.
17. **Irish J.M., R. Hovland, P.O. Krutzik, O.D. Perez, O. Bruserud, B.T. Gjertsen, and G.P. Nolan.** 2004. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell*. **118**:217-228.
 18. **Iwasaki A. and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. **5**:987-995.
 19. **Jung S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, and R.A. Lang.** 2002. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. **17**:211-20.
 20. **Kaimori A., T. Kanto, C. Kwang Limn, Y. Komoda, C. Oki, M. Inoue, H. Miyatake, I. Itose, M. Sakakibara, T. Yakushijin, T. Takehara, Y. Matsuura, and N. Hayashi.** 2004. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology*. **324**:74-83.
 21. **Kanto T., M. Inoue, H. Miyatake, A. Sato, M. Sakakibara, T. Yakushijin, C. Oki, I. Itose, N. Hiramatsu, T. Takehara, A. Kasahara, and N. Hayashi.** 2004. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. **190**:1919-1926.
 22. **Kato H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K.J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C.S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira.** 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. **441**:101-5.
 23. **Kawai T. and S. Akira.** 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ*. **13**:816-825.
 24. **Larsson M., E. Babcock, A. Grakoui, N. Shoukry, G. Lauer, C. Rice, C. Walker, and N. Bhardwaj.** 2004. Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *J Virol*. **78**:6151-6161.
 25. **Li K., E. Foy, J.C. Ferreon, M. Nakamura, A.C. Ferreon, M. Ikeda, S.C. Ray, M. Gale, and S.M. Lemon.** 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**:2992-2997.
 26. **Longman R.S., A.H. Talal, I.M. Jacobson, M.L. Albert, and C.M. Rice.** 2004. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood*. **103**:1026-1029.
 27. **Longman R.S., A.H. Talal, I.M. Jacobson, C.M. Rice, and M.L. Albert.** 2005. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. **192**:497-503.
 28. **Ludwig I.S., A.N. Lekkerkerker, E. Depla, F. Bosman, R.J. Musters, S. Depraetere, Y. van Kooyk, and T.B. Geijtenbeek.** Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *J Virol*. **78**:8322-32.
 29. **Murakami H., S.M. Akbar, H. Matsui, N. Horiike, and M. Onji.** 2004. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol*. **137**:559-565.

30. **Nigou J., C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher, and G. Puzo.** 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* **166**:7477-7485.
31. **Pasare C. and R. Medzhitov.** 2004. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity.* **21**:733-41.
32. **Piccioli D., S. Tavarini, S. Nuti, P. Colombatto, M. Brunetto, F. Bonino, P. Ciccorossi, F. Zorat, G. Pozzato, C. Comar, S. Abrignani, and A. Wack.** 2005. Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors. *J Hepatol.* **42**:61-67.
33. **Pohlmann S., J. Zhang, F. Baribaud, Z. Chen, G.J. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R.W. Doms, C.M. Rice and J.A. McKeating.** 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol.* **77**:4070-80
34. **Quinkert D., R. Bartenschlager and V. Lohmann.** 2005. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol.* **79**:13594-605.
35. **Rollier C., E. Depla, J.A. Drexhage, E.J. Verschoor, B.E. Verstrepen, A. Fatmi, C. Brinster, A. Fournillier, J.A. Whelan, M. Whelan, D. Jacobs, G. Maertens, G. Inchauspe, and J.L. Heeney.** 2003. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology.* **38**:851-858.
36. **Schnare M., G.M. Barton, A.C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov.** 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* **2**:947-950.
37. **Shoukry N.H., A.G. Cawthon, and C.M. Walker.** 2005. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol.* **58**:391-424.
38. **Schulz O., S.S. Diebold, M. Chen, T.I. Naslund, M.A. Nolte, L. Alexopoulou, Y.T. Azuma, R.A. Flavell, P. Liljestrom, and C. Reis e Sousa.** 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature.* **433**:887-92.
39. **Spörri R. and C. Reis e Sousa.** 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4(+) T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol.* **6**:163-170.
40. **Sumpter R., Y.M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S.M. Lemon, and M. Gale.** 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol.* **79**:2689-2699.
41. **Tester I., S. Smyk-Pearson, P. Wang, A. Wertheimer, E. Yao, D.M. Lewinsohn, J.E. Tavis, and H.R. Rosen.** 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med.* **201**:1725-1731.
42. **Tsubouchi E., S.M. Akbar, N. Horiike, and M. Onji.** 2004. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol.* **39**:754-762.
43. **Tsubouchi E., S.M. Akbar, H. Murakami, N. Horiike, and M. Onji.** 2004. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Clin Exp Immunol.* **137**:417-423.

44. **Yamamoto M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. **301**:640-643.
45. **Yang Y., C.T. Huang, X. Huang, and D.M. Pardoll.** 2004. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol*. **5**:508-515.

Figure 9. *HCV RNA contents in circulating immune blood cell subpopulations from viremic patients.* HCV sense-strand RNA copy numbers in FACS-purified blood T cells (CD3⁺), B cells (CD19⁺), monocytes (CD14⁺), and total DCs (CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ HLA-DR⁺) from nine viremic patients were quantified by LightCycler hybridization probe technology. The data are the averaged values for replicates from two independent measurements expressed as absolute numbers of HCV RNA molecules per 10⁶ cells. Each square indicates the detection of viral RNA from a patient, with the corresponding identification number inside the square. The solid horizontal lines represent the average for each group. Differences between T cells and other subsets, as calculated by one-way ANOVA with Tukey's test, are shown above the graph. *, $P < 0.01$ for DCs versus PBMCs.

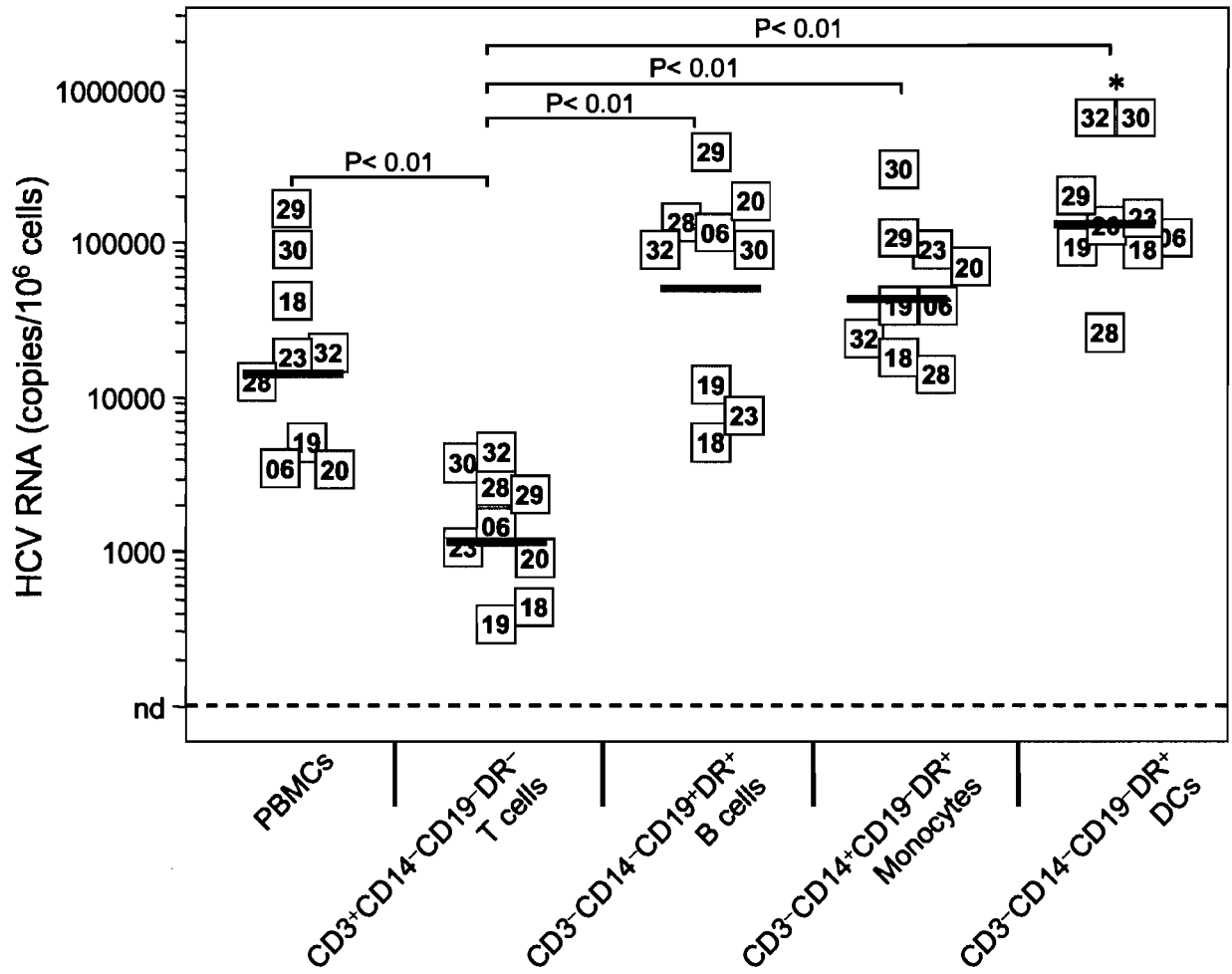


Figure 10. *MDCs display impaired response to poly(I:C) and LPS in viremic patients.* PBMCs were cultured for 1 h in the absence or presence of poly(I:C) or LPS before the addition of brefeldin A (10 μ g/ml) for a further 5 h. Cells were recovered and stained for the indicated intracellular proteins. (A) (Left) Heat map indicating \log_2 changes in IL-6, IL-12, TNF- α , and CCL3 protein expression profiles for CD14⁻ CD33⁺ MHC-II^{br} MDCs from patients, treated with poly(I:C) or LPS for 6 h, versus protein expression in the same population from healthy donors. Expression signatures for 7 healthy blood donors (D01 to D07), 2 responders (SR-P31 and SVR-P35), and 14 viremic (HCV) patients were grouped according to similarity, using the complete linkage hierarchical clustering algorithm in MeV software (left margin). Ratios of the different fluorescent intracellular antibodies (columns) were determined by calculating $\log_2(\text{MFI}^{\text{stimulated}}/\text{MFI}^{\text{unstimulated}})$ and subtracting healthy donor sample means. Each square in the grid corresponds to a flow cytometry file containing approximately 5,000 CD14⁻ CD33⁺ MHC-II^{br} cell events. Protein expression changes relative to healthy donors are indicated by the color intensity scale (red, more expression than that of healthy donors; blue, less expression than that of healthy donors; and white, no change relative to healthy donors). SB202190 (10 μ M for 30 min prior to stimulation) served as a positive control for down-regulation of the analyzed inflammatory mediators. (Right) Association between HCV RNA abundance in PBMCs (black bars), FACS-purified total DCs (CD3⁻ CD19⁻ CD14⁻ MHC-II⁺; white bars), and cytokine expression profiles (CP). The asterisk indicates that HCV quantification was not done due to an unavailability of cell samples. The solid vertical line at 10^5 on the x axis represents a reference point. Statistical analysis was done by Fisher's two-tailed exact probability test on DCs ($P = 0.004$). (B) Groupwise comparisons between healthy donors and CP-N and CP-D subjects. IL-12, TNF- α , and IL-6 increases above baseline (x -fold) ($\text{MFI}^{\text{stimulated}}/\text{MFI}^{\text{unstimulated}}$) are shown for each cluster. Combined data for poly(I:C) and LPS responses and averages (solid horizontal lines) are shown. Statistical comparisons between groups were calculated by one-way ANOVA with Tukey's test.

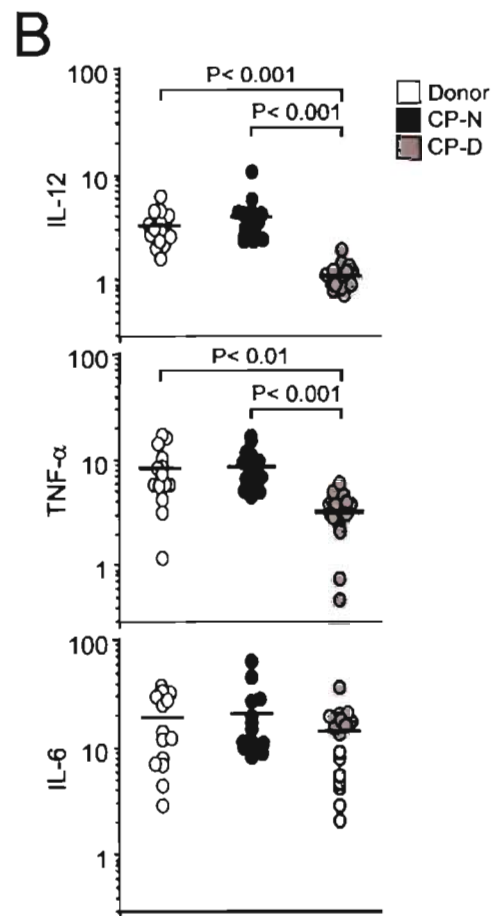
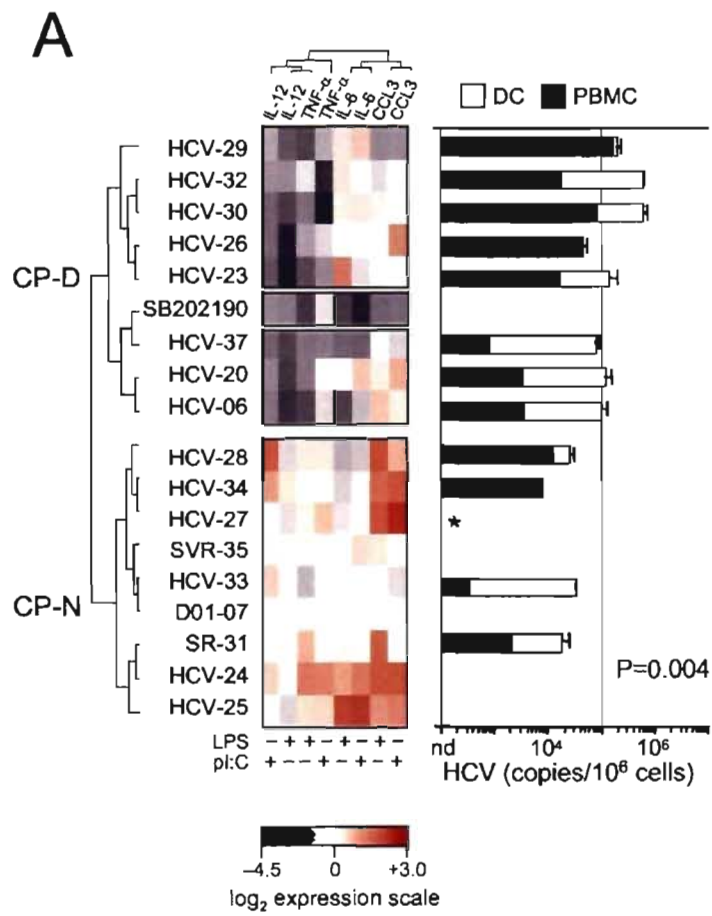


Figure 11. *Poly(I:C)* and *LPS* responsiveness in *MDCs* is associated with *HCV RNA* levels in total *DCs*. Dot plots show $\text{TNF-}\alpha$ (A) and IL-12 (B) responses (\log_2) as a function of *HCV RNA* copy numbers in FACS-purified *DCs*. Data points (two per patient) represent the mean levels of cytokine expression as \log_2 changes versus those of the donors for two independent measurements. A negative correlation was observed for *HCV*-infected patients between *HCV RNA* and IL-12 or $\text{TNF-}\alpha$ expression ($n = 10$). Correlation statistics were analyzed using the Spearman rank correlation test.

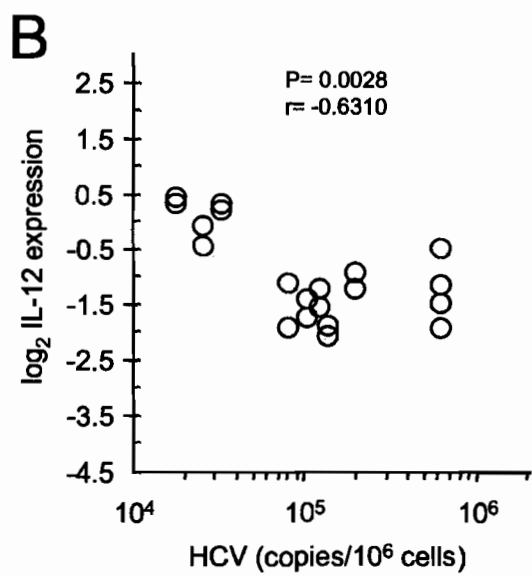
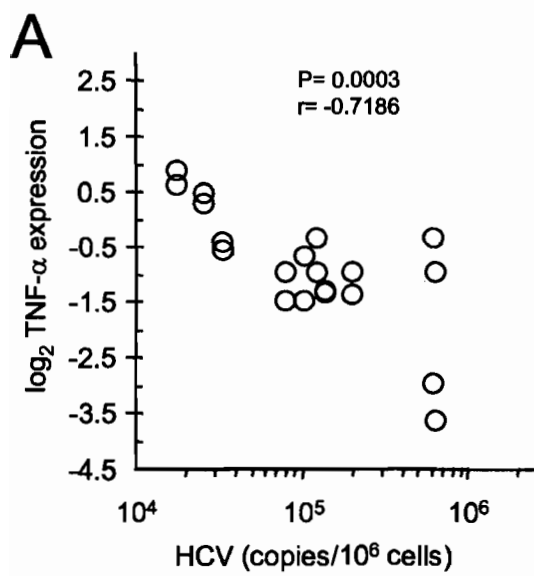


Figure 12. *Selective attenuation of poly(I:C) and LPS innate sensing in IL-6-expressing MDCs of CP-D viremic patients.* (A) Flow cytometry plots of IL-6 (x axis [top row]), TNF- α , and IL-12 (y and x axes, respectively [bottom row]) expression following stimulation in two representative patient samples (of 16), namely, HCV-P28 and HCV-P29. Histograms are gated on total MDCs (gate I) or monocytes (gate II), as shown in panel B. Arrowheads in dot plots indicate a small population of bright cells that was absent from P29. Numbers in bottom right corners and above bracketed lines indicate the percentages of cells in the designated areas. (B) CD14⁻ CD33⁺ MHC-II^{br} (gate I) and CD14⁺ CD33⁺ MHC-II⁺ (gate II) populations used for FACS analysis in the experiments shown in panel A. (C) Frequencies of IL-6⁺ MDCs positive for TNF- α and IL-12 for all patients analyzed by FACS after poly(I:C) (triangles) and LPS (circles) activation. Groupwise comparisons between healthy donors ($n = 7$) and CP-N ($n = 8$) and CP-D ($n = 8$) subjects were determined with the Mann-Whitney rank sum test and are shown at the top of the graph.

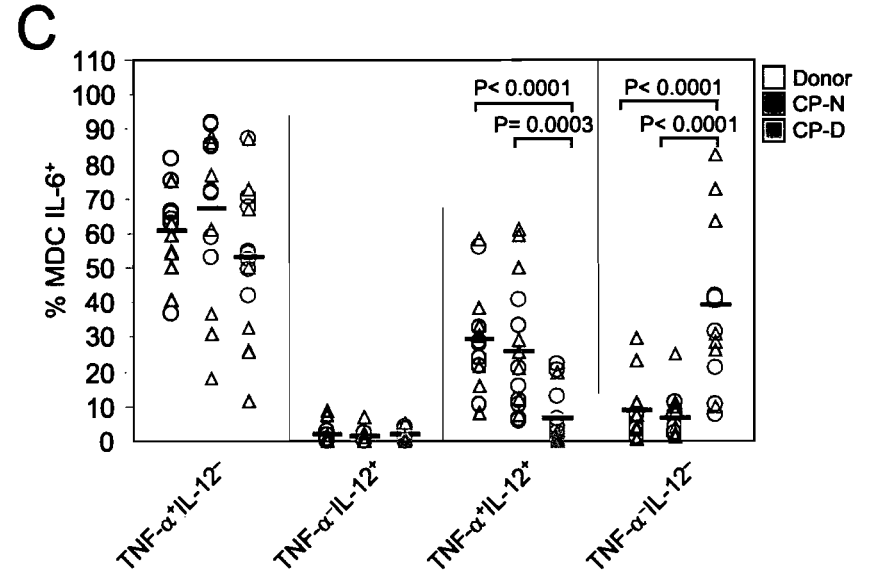
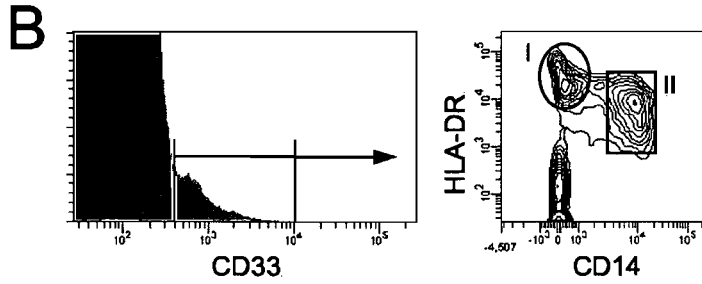
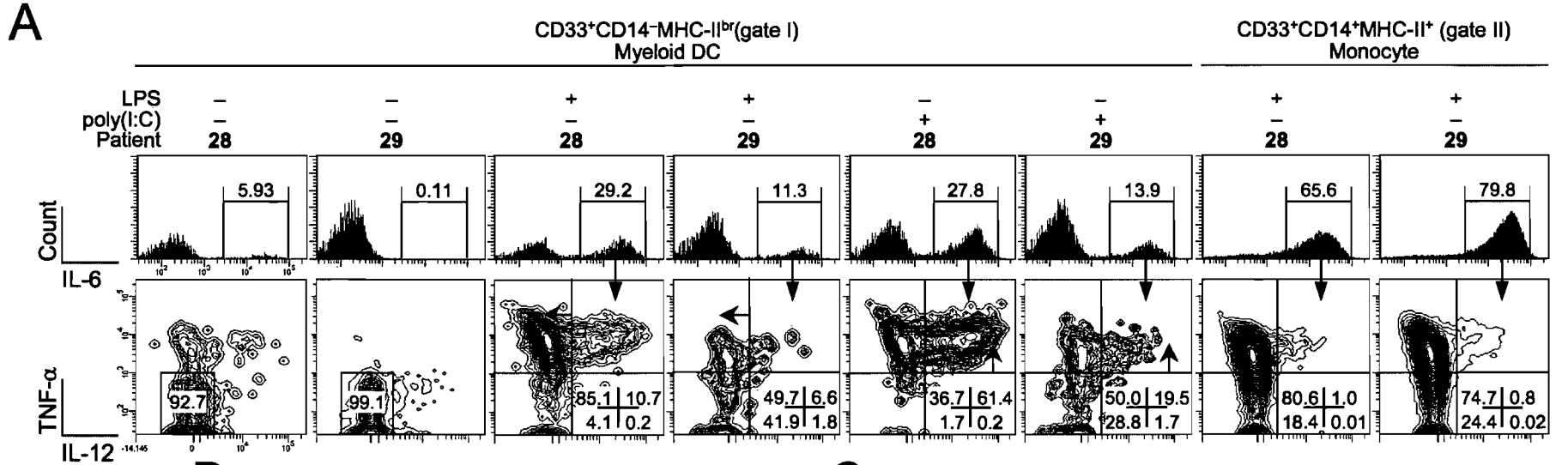


Figure 13. *Influence of HCV on peripheral blood DC subset frequencies.* Freshly isolated uncultured PBMCs (day 0) were surface stained for eight-color multiparametric flow cytometry. (A and B) Flow cytometry dot plots representative of circulating frequencies of CD3⁻ CD19⁻ gated PDCs (A) and MDCs (B) are shown for healthy volunteers (D03 [top]) and HCV-infected patients (P20 [bottom]). Gate 1 corresponds to CD303⁺ CD123^{br} CD4^{hi} CD11c⁻ CD14⁻ CD62L⁺ HLA-DR⁺ PDCs, and gate 4 corresponds to CD11c⁺ CD14⁻ CD16⁻ CD4⁺ CD123^{dim} CD62L⁺ HLA-DR^{br} MDCs. In gate 3, CD123⁺ CD303⁻ cells, which correspond to basophilic granulocytes, did not stain for HLA-DR, and gate 2 shows CD303⁻ CD16⁺ NK lymphocytes and monocytes. For each DC gate, the fraction of cells relative to the total number of PBMCs is indicated as a percentage. (C) Box-and-whisker-plot representation of circulating frequencies of CD303⁺ PDCs and CD11c⁺ MDCs in HCV-infected individuals (gray boxes; $n = 13$) and healthy age-matched controls (white boxes; $n = 7$), measured as percentages of total PBMCs collected after Ficoll separation. The ends of the boxes define the 25th and 75th percentiles, a horizontal line indicates the median, and bars define the 5th and 95th percentiles. P values were determined with the Mann-Whitney rank sum test and are shown at the top of the graph (HCV⁺ versus HCV⁻). (D and E) There is no correlation between TNF- α and IL-12 cytokine production potentials and MDC frequencies in HCV-infected patients. Correlation statistics were analyzed using the Spearman rank correlation test.

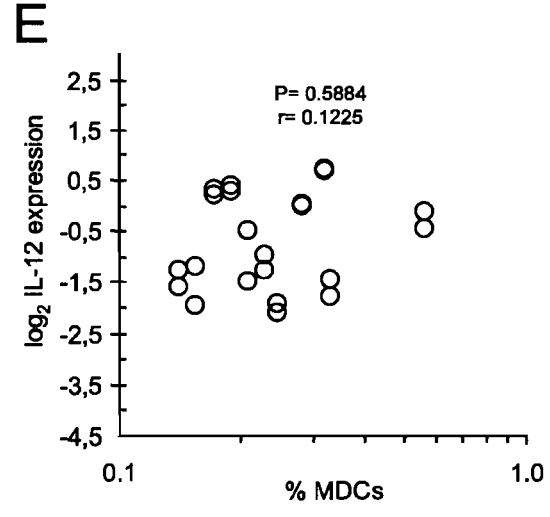
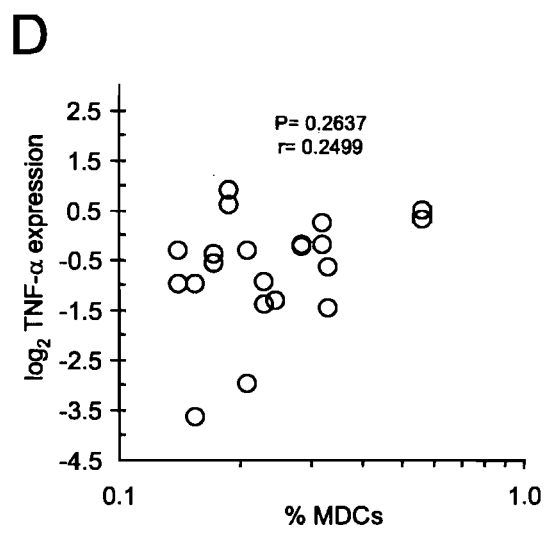
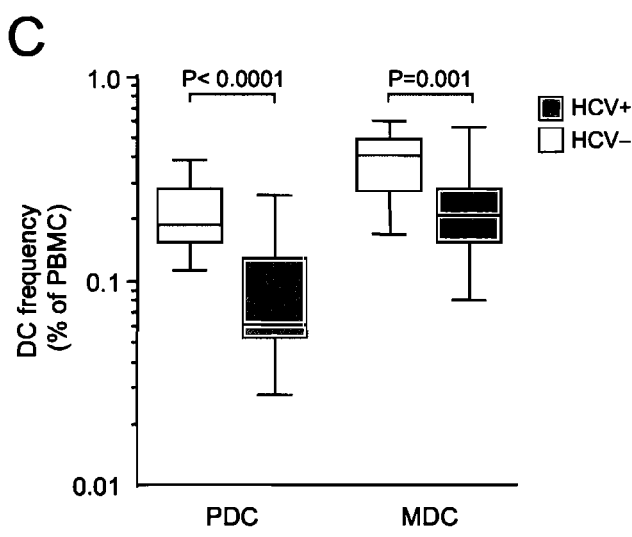
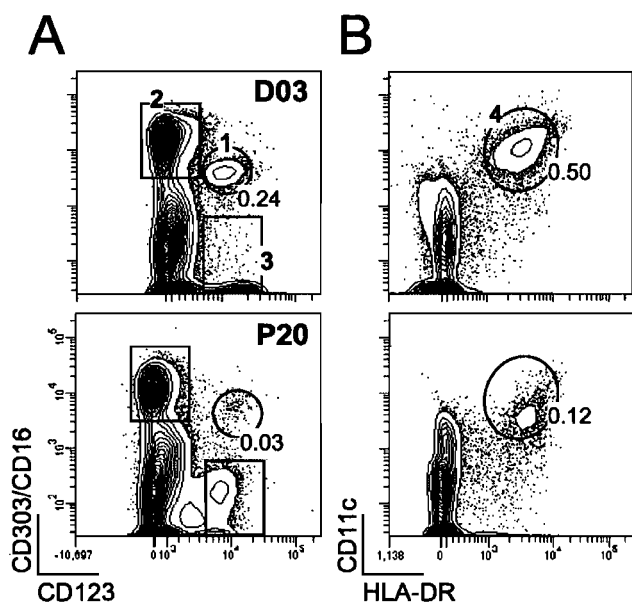


Table 4. *Clinical and demographic characteristics of the HCV-infected patients^e.*

Patient (n=18)	Age/Sex	Genotype	Viremia ^a (IU.ml ⁻¹)	Therapy	Outcome	HCV RNA ^b			Group ^d
						PBMC	DC ^f	%MDC ^c	
P06	42/M	1a	216 000	Naïve	CH	+	5.02	0.33	CP-D
P18	24/M	1a	284 000	Naïve	CH	+	4.95	0.11	NA
P19	39/M	1a	90 300	Naïve	CH	+	4.97	0.10	NA
P20	30/M	1a	1 400 000	Naïve	CH	+	5.09	0.14	CP-D
P23	52/F	1	348 000	Riba+pIFN α	NR	+	5.15	0.25	CP-D
P24	50/M	1	5 495 409	Riba+pIFN α	NR	-	< 4.35 ^f	NA	CP-N
P25	20/M	1	1 148 154	Riba+pIFN α	NR	-	< 4.35 ^f	NA	CP-N
P26	47/M	1	2 884 032	Riba+pIFN α	NR	+	NA	NA	CP-D
P27	25/M	1	2 344 228	Riba+pIFN α	NR	NA	NA	NA	CP-N
P28	46/M	1b	4 940 000	Riba+pIFN α	NR	+	4.42	0.56	CP-N
P29	59/F	1	2 880 000	Riba+pIFN α	NR	+	5.30	0.23	CP-D
P30	49/M	1	809 000	IFN α	NR	+	5.80	0.16	CP-D
P31	49/M	1	≤50	Naïve	SR	+	4.26	0.19	CP-N
P32	43/F	1	3 690 000	Naïve	CH	+	5.80	0.21	CP-D
P33	33/F	1	3 410 000	Naïve	CH	+	4.53	0.17	CP-N
P34	74/M	1	282 000	Naïve	CH	+	NA	0.32	CP-N
P35	49/M	1	≤50	Riba+pIFN α	SVR	-	< 4.35 ^f	0.28	CP-N
P37	48/M	1	NA	Riba+pIFN α	NR	+	4.91	NA	CP-D
						14/17			
						(82%)			

^a Measured with Cobas Amplicor HCV Monitor Test v2.0 at the time of collection of blood samples

^b Measured with a nested real-time qRT-PCR using hybridization probes on a LightCycler instrument. +, detected; -, below detection threshold (<100 HCV sense-strand copies per 10⁶ cells). DC data are log₁₀ copies (10⁻⁶) FACS-obtained total DCs (MHC-II⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻).

^c Frequency of CD11c⁺ CD14⁻ CD16⁻ CD4⁺ CD123^{dim} CD62L⁺ HLA-DR^{br} MDCs in blood.

^d Clinical sub-groups of patients identified as based on MDC functionality (see Fig. 10).

^e Abbreviations: M, male; F, female; IFN α , interferon- α monotherapy; Riba+pIFN α , ribavirin & pegylated interferon- α combined therapy; CH, chronic; NR, nonresponse; SR, spontaneous resolver; SVR, sustained viral response; NA, not available.

^f *,maximum possible HCV RNA abundance estimate based on DC frequency (MDC + PDC) assuming that less than 100 copies per 10⁶ PBMCs (below detection threshold) are concentrated in blood DCs: log₁₀[100 HCV molecules / %DC of PBMCs]; average (0.45%) for cluster group CP-N was used for P24 and P25

Table 5. *Oligonucleotides used for real-time RT-PCR Quantifications.*

PCR primers	
HCV-out5	5'-CGTCTAGCCATGGCGTTAGTA-3'
HCV-out3	5'-CGGTTGGTGTTCCTTTTGGTT-3'
HCV-in5	5'-TCTGCGGAACCGGTGAGTA-3'
HCV-in3	5'-CAAGCACCTATCAGGCAGTA-3'
GAPDH-out5	5'-GGTCGGAGTCAACGGATT-3'
GAPDH-out3	5'-GCCATCACGCCACAGTT-3'
GAPDH-in5	5'-TTCCATGGCACCGTCAA-3'
GAPDH-in3	5'-GTCCTTCCACGATACCAAA-3'
Strand-Tag	5'-GCTCATGGTGGCGAATAA-3'
LightCycler hybridization probes	
HCV-P1	5'-ATTGGGCGTGCCCCCGCAAGAf-3'
HCV-P2	5'-XCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCp-3'
GAPDH-P1	5'-GTCCTGGAAGATGGTGATGGGATTf-3'
GAPDH-P2	5'-XCCATTGATGACAAGCTTCCCGTTCTCp-3'

^af, fluorescein donor; p, 3' phosphate blocking group.

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE 02

CONTEXTE ET PORTÉE

L'article scientifique qui suit fait état des résultats obtenus en lien avec l'identification de deux points de contrôle critiques par lesquels les interactions VHC/MDC semblent empêcher le renouvellement d'un répertoire CD8⁺ VHC-spécifique fonctionnellement compétent pendant la maladie chronique. Cet article sera soumis à la revue *Journal of Experimental Medicine* et est reproduit ici avec l'accord des co-auteurs.

La suite du projet de recherche proposait d'étudier si l'expression endogène de la NS3/4A agit comme antagoniste des cascades de signalisation du TLR3 et de son proche voisin, le TLR4, dans les MDC infectées *in vivo* par le VHC. Pour cette partie de l'étude, nous avons recruté une cohorte de patients virémiques (n=22; se référer au Tableau 8) qui ont été suivis longitudinalement sur une année (4-5 visites). Pour montrer que l'expression de la NS3/4A et/ou la réplication virale interfère spécifiquement avec la fonction de l'adaptateur TRIF dans les MDC de patients virémiques CP-D, des PBMC isolés et cryopréservés ont été stimulés six et 24 heures pour analyser par cytométrie polychromatique la capacité des TLR3 et TLR4 (TRIF) versus le TLR8 (MyD88) à conduire à l'expression des gènes IL-12, IL-6, TNF- α , CD86, CD197 (CCR7), CD274 (PD-L1) dans des MDC (lignage⁻CD8 α ⁻CD14⁻CD16⁻CD45⁺CD11c⁺MHC-II^{br}). Dans ces expériences, l'IL-6 servait de contrôle pour illustrer la spécificité de l'inhibition puisqu'il s'agit d'un promoteur dont la transcription ne dépend pas de la voie TRIF, contrairement à l'IL-12 et au TNF- α , et qui n'est pas inhibé par le VHC (chapitre II). Ces expériences ont permis de montrer qu'il y a synthèse intacte de TNF- α et d'IL-12 suite à l'engagement du TLR8 contrairement au TLR3 et au TLR4 (Fig. 15), puisque seule la voie TRIF-dépendante n'est pas activée dans les MDC infectées. D'ailleurs, la restauration de ces fonctions par les inhibiteurs BILN-2061 (protéase, PI) et VIR235 (polymérase, PolI) démontre que l'activité protéolytique de la NS3 ainsi que la réplication virale interfèrent avec l'activation de la voie TRIF dans ces MDC infectées. Nous montrons également que cette interférence viro-induite est impliquée dans la faible qualité de la réponse des cellules CD8⁺ VHC-spécifiques. L'ensemble

de ces travaux contribue à notre compréhension des mécanismes mis en œuvre par le VHC pour déjouer l'immunité innée et interférer avec le développement d'une réponse adaptative efficace (du moins pour ce qui est des CTL).

PATHOGENIC INTERPLAYS BETWEEN HEPATITIS C VIRUS, MYELOID DENDRITIC CELL FUNCTIONS AND VIRUS-SPECIFIC CD8⁺ T CELL RESPONSES IN CHRONICALLY INFECTED PATIENTS


Ian Gaël Rodrigue-Gervais^{1,2,3}, Hawley Rigsby^{1,2}, Loubna Jouan^{1,4}, Dominique Sauv ^{1,3}, Rafick-Pierre S kaly^{1,2,3}, Bernard Willems^{1,4} and Daniel Lamarre^{1,2,4,5*}

From Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,¹ INSERM U743,² Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1 and Département de Microbiologie et Immunologie,³ Médecine,⁴ and Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie,⁵ Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Running title: HCV infection evades recognition by MDCs

Presented in part at the 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, Scotland, September 9-13, 2007.

(  être soumis au Journal of Experimental Medicine)

***Corresponding author.** Mailing address: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Saint-Luc, 264 boul. René-Lévesque Est, Rm EA-312, Montréal, Qc, H2X 1P1. Phone: 514-8908000-35258. Fax: 514-4127314. E-mail: 

[Abstract: 264 words; Text: 9 671 words]

ABSTRACT

The presence of myeloid dendritic cells (MDC) with impaired TLR3 and TLR4 microbial sensing characterizes chronic hepatitis C virus (HCV) infection; however, the underlying mechanism that causes these cells to become unresponsive to danger stimuli in the periphery and the role that this defect plays in viral persistence are unknown. Here we report that MDCs from viremic patients with impaired TLR3 and TLR4 agonist responsiveness (cytokine profile defective, CP-D), followed longitudinally for up to one year, expressed up-regulated surface levels of PD-L1 and maintained intact TLR7/8-receptor induced cytokine production (TNF- α and IL-12). Pre-treatment with small-molecule inhibitors of NS3/4A protease and NS5B polymerase restored the suppressed responsiveness to LPS coincident with drug sensitivity in CP-D individuals. Under viremic conditions where MDCs displayed normal TLR3/4 functions (subgroup CP-N), an improvement (i.e. increased polyfunctionality) in the quality of HCV-specific CD8⁺ T cell responses was observed (~20% exhibiting 2 or more simultaneous effector functions). Improved functionality of CD8⁺ T cells correlated with predictors of MDC functionality: positively with TLR activity and inversely with cell-associated HCV RNA viral loads. Thus, HCV virus-host interactions appear to have two distinct impacts on peripheral MDCs: inhibition (*via* virus-dependent desensitization) of some but not all TLR receptors, and cell-surface augmentation of PD-1's known ligand, PD-L1. In turn, the presence of PD-L1-expressing defective MDCs in the infected host prevents the renewal of a functionally competent HCV-specific CD8⁺ T cell repertoire during chronic disease. The reversibility of the defect in MDC innate sensing function provides a potential pharmacological target for enhancing both microbial innate immunity and T cell responses to HCV in chronically infected individuals.

INTRODUCTION

Hepatitis C is a major persistent infectious disease. Its persistence is, in part, due to the failure of the host's immune system to effectively clear the infection and generate protective immunity. Despite extensive efforts, it is not clear how HCV-specific

cellular immunity fails in most individuals. Any model of immune evasion brought forward is required to explain defects in cellular immunity that are exquisitely HCV-specific in persistently infected individuals who have otherwise normal immune functions (11). This would appear to exclude, for example, indirect suppression of T cell activity by viral proteins binding ubiquitous surface receptors (e.g. gC1qR) (45). One model that has recently attracted much attention stems from the discovery that the inhibitory program death receptor (PD-1), a cell-surface molecule that marks "exhausted" T cells (28), is generally upregulated on HCV-specific CD8⁺ T cells in chronic disease (31, 70, 87). Unlike HIV infection (15, 86, 93), PD-1 expression patterns alone do not conclusively predict the differential clinical outcomes of HCV infection (41). Synergy of PD-1 with other qualitative parameters could, therefore, play a role in the decreased capacity of these patients to restrict HCV infection.

As a general rule, pathogenic viruses that persist within the host rarely behave as inert antigens once they are recognized by the innate immune's sensing arm, including the Toll-like receptor (TLR) family (23). Virus-induced defects in dendritic cell (DC) innate sensing may represent an evolutionary adaptation that favors (with other factors, e.g. PD-1) persistent infection in an otherwise immunocompetent host and prolonged host-parasite coexistence. DCs are central to the immune system: by surveying, deciphering, and quickly responding to danger signals through their TLRs, they become licensed to present components of pathogens to circulating T cells and initiate an antigen-specific immune response that clears an infection (84). However, processing/presentation of HCV antigens by DCs may in fact prove to be a double-edged sword: in order to induce HCV-specific immune responses it is necessary for DCs to interact with HCV to deliver antigens and appropriate signals to T cells, however, in doing so, this leaves DCs susceptible to functional alterations by the virus. This susceptibility may help explain, mechanistically, how the deficit in HCV-specific cellular immunity establishes itself *in vivo*. How DCs factor into the control of HCV viremia remains unclear; however, the quality of the interaction between pathogens and DCs (through their TLRs) does affect the functional outcome of the adaptive immune response (63, 83).

A subset of TLRs (TLR3, 4, 7, 8, 9) appears dedicated to sensing viral products and inducing secretion of IFN- α/β and pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-6, IL-12 and TNF- α). For example, the P554A mutation in human TLR3 confers a predisposition to neurovirulent HSV-1 infection (94). Four (TLR3, 7, 8, 9) are endosomal TLRs that all share the property of being activated by nucleic acids that are produced in the course of viral infections (68). TLR3 can be stimulated by double-stranded (ds)RNA (1)(12); TLR7 and 8 (in humans only) by antiviral derivatives of nucleoside-like imidazoquinoline (32) and GU-rich single-stranded (ss)RNAs (19, 37); and TLR9 by unmethylated viral CpG-rich DNA (35). TLRs activate a canonical, inflammatory signaling pathway via MyD88, a TIR domain-containing molecule which binds to all TLRs, with the exception of TLR3 (64). The extracellular, ligand-binding domain of TLR3 contains 23 contiguous leucine-rich repeats (LRR) forming a large, horseshoe-shaped solenoid (13)(93), with LRR20 thought to be critical for dsRNA binding (8). After dsRNA binding, the cytoplasmic domain of TLR3 recruits the adaptor molecule TRIF through homophilic TIR-TIR interactions in a MyD88-independent pathway, which then activates the TBK-1 and IKK ϵ kinases together with TRAF3 and NAP1, much like the CARD adaptor IPS-1 (also referred to as MAVS/VISA/Cardif) does for the recently identified IFN-inducible DExD/H box RNA-helicase RIG-I (60). This also holds true upon recognition of LPS by TLR4 because TRIF is shared by both TLRs (24), and no other unique downstream factor between the pathways is identified as important for activating IRF3 and the subsequent production of inflammatory cytokines and type I IFNs. In TRIF-deficient mice (91), IFN- β , IL-12, TNF- α and upregulation of costimulatory molecules are not induced by TLR4 (even with continued intact MyD88 activity), whereas the responses to stimulation of the intracellular receptors TLR7, 8, and 9, which activate inflammatory genes solely via the formation of a MyD88-TRAF6-IRF7 complex (43), are not impaired.

The NS3/4A serine protease encoded by the RNA genome of HCV cleaves TRIF (22, 52) and IPS-1 (56, 59) to ablate TLR3 and RIG-I signaling of IRF3 activation by dsRNA. NS3/4A is a complex, bifunctional protein that is essential for non-structural (NS) protein processing and viral RNA replication (62). HCV infection therefore

imparts points of control over host innate defense that are amenable to therapeutic modification by antiviral drug compounds that inhibit the NS3/4A protease activity (40). However, it remains unclear whether TLR evasion at the DC level plays a role in natural HCV infection in humans, as opposed to experimental infection systems. This biological question is important because natural infection may act differently on host defenses. Although many recent studies have suggested that TLRs on myeloid DCs (MDC) are impaired in HCV infection (4, 5, 17), this has not been unambiguously demonstrated (77). In particular, no virus-induced mechanism involving evasion from TLRs (or RIG-I) in DCs has been identified, to date, in patients. In the myeloid lineage, monocytes express TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 and 9; MDCs express TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 10 as well as RIG-I, but hardly any TLR7 (51). We earlier reported an attenuation of poly(I:C) (a synthetic analog of dsRNA) and LPS innate sensing by a small proportion of MDCs from viremic patients, as long as the total DCs (and PBMCs) in those patients contained high levels of cell-associated HCV RNA viral loads (72). The range of agonists to which TLR responses are affected by HCV virus-host interactions within the MDC subset remains unclear as only LPS and poly(I:C) have been studied thus far.

The normal induction of an IFN- α/β -induced antiviral state in response to TLR7 in HCV genotype 1 replicon lines (50) raises the possibility that HCV may not prevent the induction of cytokines by MDCs in response to MyD88-dependent TLR agonists in infected individuals. Here, we analyzed MDC functions in blood in response to a panel of TLR agonists through the use of multiparametric flow cytometry. We clearly identified that MDCs from a subgroup of viremic patients (CP-D) that exhibit stable defective TRIF-dependent danger sensing activities in relation to cell-associated HCV genomic RNA copy density (cVLs), maintained intact MyD88-coupled TLR8 functions. This difference in TLR potential proved useful in examining the molecular mechanistic basis for the observed attenuation of innate sensing in MDCs of viremic HCV-infected patients and relating this to an HCV antigen-specific lesion in CD8⁺ cellular immunity. Our findings reveal two checkpoints whereby virus-host MDC interactions and persistent viremia act to prevent the renewal of a functionally competent HCV-specific CD8⁺ T cell repertoire during chronic disease: (1) a shift in

the quality of antigen-specific CD8⁺ T cell responses through evasion of TRIF-dependent activation of innate immunity; (2) control of CD8⁺ effector numbers in the tissues by PD-1/PD-L1.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects. Only patients not receiving antiviral therapy were recruited by the hepatology experimental unit of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM, Hôpital Saint-Luc), although some subjects had a previous history of therapy (online supplemental Table 8). Clinical protocols conformed to ethical guidelines of the authors' institutions and all subjects gave written informed consent. Patients 28-31 and 35 have been described in a separate report (72). Patient P55 began treatment with ribavirin and pegylated interferon- α_2 at week 27 post-study entry and remained on therapy for 6 months; during this period of treatment, he constantly had levels of viremia of <50 HCV RNA copies per ml as early as eight weeks after treatment onset. The samples used in this study were up to week 27, at which time his TLR response profile had not changed (see Fig. 15). Efforts were made to enroll subjects with spontaneous clinical control of viremia (SR), and the number of these subjects in this study do not reflect their frequency of occurrence in the overall HCV-positive population. The number and specific characteristics of the subjects in each group are provided in Table 6. Control healthy subjects were documented to be HBV-, HCV- and HIV-1-seronegative. Plasma viral loads were measured by the Cobas AmpliPrep/TaqMan HCV Test (Roche). Peripheral blood was collected in heparin preparation tubes (Vacutainer Systems, Becton Dickinson, Franklin, New Jersey). PBMCs were obtained by standard Ficoll-Paque density gradient centrifugation and cryopreserved at -140°C at 10×10^6 cells/ml in fetal calf serum (Sigma-Aldrich) containing 10% DMSO until use.

Antibodies, TLR agonists, peptides and inhibitors. Directly conjugated mAbs, specific for the molecules listed (with clone), were purchased from the following: IFN- γ -fluorescein isothiocyanate (FITC; B28), IL-2-phycoerythrin (PE; 5344.111), IL-6-PE (MQ2-6A3), IL-12 p40/p70-allophycocyanin (APC; C11.5), TNF- α -PECy7

(mAb11), CD3-AmCyan (SK7), CD3-Alexa 700 (UCHT1), CD4-peridinin chlorophyll protein (PerCP)-Cy5.5 (SK3), CD8 α -AmCyan (SK1), CD19-AmCyan (SJ25C1), CD11c-PECy5.5 (B-ly6), CD14-Pacific Blue or -PE (M5E2), CD16-FITC (3G8), CD45-PerCP-Cy-5.5. (2D1), CD86-APC (2331/FUN-1), CD107a PECy5 (H4A3), CD197/CCR7-PECy7 (3D12), CD274/PD-L1-PE or PECy7 (MIH-1), HLA-DR-Cy7APC (L243) from BD Biosciences; CD11c biotin (3.9) from Ancell; CD19 Pacific Blue (HIB19), CD27-APC-Alexa 750 (0323), CD279/PD-1-APC (MIH4) from eBioscience; and CD16-Texas red-PE (ECD; 3G8) and CD45RO-ECD (UCHL1) from Beckman Coulter. The following TLR agonists were used at the indicated final titrated concentrations: a synthetic analog of dsRNA, polyinosine-polycytidylic acid ([poly(I:C)], a TLR-3 agonist; 25 μ g/ml), and single-stranded RNA40 (TLR-7/8 agonist; 5 μ g/ml) were purchased from InvivoGen (San Diego, CA); lipopolysaccharide (LPS from *E. coli* 055:B5, a TLR-4 agonist; 0.1 μ g/ml) from Sigma-Aldrich; 3M-002 (a TLR-8 agonist; 5 μ M) and 3M-011 (a TLR-7/8 agonist; 5 μ M) (32) both provided by 3M Pharmaceuticals (St Paul, MN). Peptides (18-mers overlapping by 11) corresponding to HCV H77c strain full-length NS3 and NS5B (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) were used at 2 μ g/ml each peptide in PBMC assays. Lyophilized peptides were reconstituted to 0.2 mg/ml in 100% DMSO for the peptide mixes. Four mixes were prepared, two each for full-length NS3 and NS5B. Optimized peptides (9-mers) covering immunodominant regions of CMV, EBV, and influenza were purchased from PANATecs (Tübingen, Germany) and used as described above. HCV antivirals (BILN2061 and VIR235) were provided by Virochem Pharma, were >95% pure by high performance chromatography, and were dissolved in DMSO (1 mM and 10 mM, respectively) and stored at -80°C .

Activation and staining of cells. For MDC assay, longitudinal cryopreserved PBMC samples were thawed in the presence of 50 U/ml Benzonase nuclease, transferred to 96 V-well plates (1.25×10^6 cells/well) and rested for 12 h in complete RPMI medium (RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin sulfate, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino

acids and 10 mM HEPES; referred as R10) at 37°C, in 5% CO₂. Analysis of CD86, CCR7 and CD274 surface expression by flow cytometry was performed on unrested cells cultured in RPMI with immediate TLR agonists stimulation (24 hours); controls with media alone (unstimulated) were systematically added to measure basal levels. Stimulatory TLR agonists (pretitered), brefeldin A (10 µg/ml final concentration; Sigma-Aldrich), and in some cases NS3 protease (1 µM; BILN2061), NS5B polymerase (10 µM; VIR235) viral inhibitors, or vehicle alone (0.1% DMSO) were added for cytokine production experiments. Control conditions included the absence of agonists to control for spontaneous, non-agonist-specific cytokine synthesis. After 6 hours of activation, anti-TNF-α-PECy7, anti-IL-6-PE and anti-IL-12-APC antibodies were used to assess the response of MDCs to TLR agonists. RNA was isolated from 2.5x10⁶ PBMCs from the samples stimulated using Qiagen's RNeasy Mini columns. Nested real-time qRT-PCR quantification of HCV cVL in PBMCs was performed on a RotorGene RG-3000 instrument; this assay allows the detection of ≥100 copies of HCV in 10⁶ PBMCs (72). HCV percent inhibition (% inhibition) was calculated as follows: $[(cVL^{vehicle} - cVL^{treated})/cVL^{vehicle}] \times 100$, where cVL^{treated} represents compound-treated samples and cVL^{vehicle} is the value for 0.1% DMSO final concentration vehicle control. Samples with cVL values of <2.0 log₁₀ copies x10⁻⁶ PBMC were treated as negative and were assigned a value of 100 RNA molecules for statistical analyses.

For measuring antigen-specific T cell responses, cell stimulations and staining were performed using a modified version of the method described by Betts *et al.* (9). Thawed PBMCs (5 x10⁶ cells/ml), were rested 12 hours at 37°C in the presence of DNase (10 U/ml) in 50 cc conical Falcon tubes. Cells were then washed with R10, examined for viability by trypan blue exclusion (typically ≥90%) and readjusted to 20 x10⁶ cells/ml. Costimulatory antibodies (anti-CD28 and CD49d, 1 µg/ml final concentration; BD Biosciences), monensin (5 µg/ml final concentration; Sigma-Aldrich), brefeldin A (5 µg/ml final concentration), and anti-CD107a-PECy5 (pretitered volume) were added to cells, which were then transferred in 100 µl aliquots to 96 V-well plates containing 100 µl of each peptide mix. A negative

control containing PBMCs from the same individuals but with no added peptide and a SEB positive control to ensure that cells were responsive (*Staphylococcus enterotoxin B*, 0.2 μ g/ml final concentration; Toxin Technology) were included for all samples in each assay. Cells were incubated for 5.5 hours at 37°C. Following incubation, cells were surface stained with the appropriate antibodies and the violet viability dye ViViD (65) for 30 minutes in the dark at 4°C. After intracellular staining for IFN- γ , IL-2 and TNF- α , the cells were fixed in PBS containing 1% formaldehyde and stored at 4°C in the dark until flow cytometric analysis (performed within 24 hours).

Flow cytometric analysis. Polychromatic FACS data was acquired on a LSRII™ (BD Immunocytometry) flow cytometer equipped for the detection of 11 fluorescent parameters. A minimum of 1.0×10^6 events in the live cell gate, as defined by forward and side scatter, were accumulated for each sample. Data analysis was performed using FACS DiVa version 5.0.2 software. Initial gating of each sample set used a forward scatter (FSC)-area versus a FSC-height plot to gate out cell aggregates. Analysis of MDCs involved CD3⁺, CD19⁺ and CD8 α ⁺ lymphocytes exclusion using a dump channel and the remaining events were subjected to a HLA-DR versus a side scatter (SSC)-height gate to isolate MHC-II^{br} antigen-presenting cells. Following this, MDCs were selected by sequentially gating on CD45⁺, CD11c⁺, CD14⁻, and CD16⁻ to generate MFI values for each cytokine in this cell type. As a subset, MDCs were <1% of PBMC. Responses to stimuli were considered positive if the frequency of IL-6 cytokine-producing MDCs was ≥ 3 -times the frequency to media alone. Cytokine clustering analysis was done by inputting the log₂ ratio of fluorescence intensity values of intracellular FACS staining of positive events ($MFI^{\text{Stimulated}}/MFI^{\text{Unstimulated}}$) normalized to the mean of the measured cytokine across the reference control group into MeV array software (<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>). For these hierarchical clustering analyses, which group individual datum points together based on similarity or disparity, cytokine protein expression in the lineage[CD3,14,19]⁻CD8 α ⁻CD16⁻CD45⁺CD11c⁺MHC-II^{br} MDC population from HCV patients activated with TLR agonist was presented as a log₂ 'factor-change' in MFI versus protein expression in the MDC population from aviremic resolvers. The

\log_2 'factor-change' in MFI is represented using a color scale, where increasing blue to red color indicates increased expression and white indicates no change from aviremic resolvers (Fig. 15A). Differences in percentages of cytokine producing MDCs (IL-12/TNF- α) were analyzed by gating on activated IL-6⁺ MDCs. By gating on the IL-6⁺ MDCs subset before measuring IL-12 and TNF- α production, specific differences are effectively normalized and resolved at the single cell level as described previously (72).

CD8⁺ T cells were selected by first gating out CD14⁺, CD19⁺ and dead cells (Pacific-Blue dump channel), and subsequently gating on small lymphocytes (FSC and side scatter properties), CD3⁺, CD4⁻, and CD8⁺ events. All T cell markers were plotted versus IFN- γ in order to include stimulated cells that had down-regulated surface marker expression. Seven HCV-seronegative donors were screened with the same protocol. To establish a precise definition of positive responses, net (i.e., minus background) CD8⁺ T cells responses to the NS3 and NS5B peptide pools in HCV-seronegative healthy subjects (n=7) were analyzed. The flow cytometric profiles of these analyses lacked clear-cut response clusters, and net response frequencies of CD8⁺ analyses formed a normal distribution with a mean of 0 (cytokines) and 0.01 (CD107a), and 2 SD equaling 0.01% for CD8⁺ IFN- γ , IL-2 and TNF- α analyses or 0.03% for CD107a. These 2-SD frequencies were adopted as our cut-off for a positive response to a peptide pool to rule out stringently any spurious responses in our overall data analysis. Thus, net response frequencies of <0.01% (cytokines) or <0.03% (CD107a) for CD8⁺ T cells were counted as undetectable responses, and patients were considered to have positive HCV responses if they were above the 2 SD threshold for any one of the aforementioned functions. Since HCV proteins were analyzed in parts, a positive response by these criteria by any peptide submix constituted an HCV-specific response, and if one or more such positive responses were identified, these responses were summed to calculate a total HCV NS3 or NS5B-specific response frequency. Boolean combination of single-function gates (shown in Fig. 18A) were created to determine the frequency of each response based on all possible combinations (up to 15) of cytokines and CD107a expression. A lower

threshold corresponding to 2 SDs above background was built for each specific functional combination, and values below this threshold were set to zero. Total frequencies of virus-specific CD8⁺ T cells were calculated by summing the frequencies within each unique combination of functions (counting each responding cell only once). Because the antigen-specific responders derived almost exclusively from the memory subset (see Fig. 18B) and the fraction of memory cells within the overall CD8⁺ T cell population proved to be widely variable among our cohort of subjects (ranging from less than 35% to almost 92%), we normalized all observed frequencies (which were relative to the overall CD8⁺ population) to the CD8⁺ memory subset. In this way, the reported frequencies reflect the frequencies of antigen-specific responders within the CD8⁺ memory T cell population, and were determined by dividing the background adjusted frequencies (net) in antigen-stimulated cultures by the fraction of total CD8⁺ T cells with a memory phenotype. Note that the term memory is used to denote the overall compartment of previously activated, peripheral T cells, including effector or effector memory populations.

Statistics. Statistical analysis was performed using the Vassar website (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>) and the GraphPad Prism software v3.0 statistical package. All tests were two-tailed and P-values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

MDCs from CP-D viremic patients exhibit a stable functional defect restricted to their TRIF-dependent danger sensing activities. The response of MDCs (lineage⁻CD8 α ⁻CD16⁻CD45⁺CD11c⁺MHC-II^{br}) to TLR agonists was tested in PBMCs by FACS intracellular staining for IL-6, IL-12 and TNF- α . PBMCs from chronically HCV-infected individuals (n= 19) and aviremic clinical resolvers (n= 12) were stimulated with various TLR agonists characterized to have potent cytokine-inducing capacity in healthy donor MDCs (Fig. 14 and row D01-06 of dendrogram, Fig. 15A). IL-6 induction (not shown) was not impaired across all patients as previously reported (72). Agonists of TLR7/8 (3M-011) and TLR8 (3M-002) induced

strong levels of IL-12 and TNF- α (Fig. 14) as measured by intracellular cytometry after 6 hours of stimulation in both aviremic and viremic patients. Similar results were obtained with the TLR7/8 agonist GU-rich ssRNA40. Consistent with prior results (4, 5, 17, 72), attenuated induction of IL-12 and TNF- α was observed after TLR3 ([poly(I:C)]) and TLR4 (LPS) stimulation of viremic patient samples. Although, the TLR3 and TLR4 response potentials for the overall viremic cohort was significantly decreased compared to aviremics, the data in Fig. 14 suggests the possibility of a bimodal distribution of these potentials among chronically infected subjects, rather than a general, uniform shift towards lower levels. Therefore we examined whether there were any observable biological trends among donor-to-donor variability in TLR-induced cytokine expression profiles (CP) of viremic patients as we reported for another cohort (72). In particular, it was important to know whether response to selective agonists or certain patient types were inherently more or less attenuated than others across HCV infection over time.

We examined TLR-induced IL-12 and TNF- α expression in a sample of 19 patients (where multiple longitudinal visits existed) representing all patient groups (Fig. 15). To identify pathway- and patient-specific defects, we plotted the FACS cytokine expression \log_2 fold-changes in IL-12 and TNF- α protein expression for each condition as a heat map with agonists on the x axis and patient samples on the y axis and performed hierarchical clustering using microarray analysis software (38, 39). We have previously used this approach to identify aberrant TLR-induced cytokine production in MDCs of viremic individuals (72). The \log_2 fold-change is a normalization equation whereby the MFI ratio value on a particular cytokine in a particular stimulation condition is divided by the median of the measured cytokine across the reference control group (in this instance, aviremic subjects). \log_2 conversion of this fold-change results in measured cytokines having the mean of the reference group to have values of zero (indicated by white colored squares), ensuring that cytokines inhibited potently by HCV are represented by negative values (in blue), while those not affected are represented by positive values (in red) relatively to expression in the MDC populations from aviremics ($n= 8$). In order to demonstrate

the relationship between the heat map data and the primary flow cytometry data, LPS and 3M-002 stimulation in two representative patients is shown with histograms for TNF- α (Fig. 15C). When examining the clustered dendrogram (Fig. 15A, top), it is notable that agonists of the TRIF- and MyD88-associated sensing pathways appear at opposite sides of the dendrogram. A decrease in expression levels at the left compared to the right of the dendrogram, restricted to the CP-defective (CP-D) cluster, illustrates a lack of response to poly(I:C) and LPS (agonists of the TRIF-associated sensing pathway) in 64% of viremic patients (see Table 6). CP-D patients maintain intact TLR7/8-receptor induced TNF- α production (MyD88-associated responses) in the face of compromised TRIF-coupled pathway responsiveness ($P < 0.0001$; Fig. 15B). Results are similar for IL-12 (see Fig. 15A). It should be noted that, as reported previously by our group, a significant association is found between the fold-change in cytokine production by TLR3 and TLR4 agonists and cVL levels in viremic patients ($P < 0.05$; Table 6). The presence of a CP-N phenotype was characteristic of cells exhibiting low or undetectable cVL levels.

To determine whether the initial phenotypes observed are maintained over time we tracked the TLR potential longitudinally in all 11 viremic patients. These phenotypes did not appear to be secondary to clinical disease events (i.e. liver pathology): in CP-N patients, the increased TLR responses were stable over weeks (Fig. 15D) to one year (not shown). Moreover, there were no clinical characteristics that either correlated with or predicted those subjects with preserved TRIF-dependent TLR potentials (CP-N subgroup), including infecting genotype, history of antiviral therapy, AST and ALT levels or plasma viral load [pVL] (Table 6). Thus, all viremic subjects either preserved or decreased their TLR potentials (to select agonists) over time, independently of disease progression, but coincidentally with cVL levels. These findings are consistent with our contention that emergence of defective MDCs in the periphery is a result of direct virus-induced dysfunctions through physical interactions with the affected cells rather than a consequence of MDC exposure to progressive chronic viral disease. They also demonstrate that HCV specifically attenuates TRIF- but not MyD88-coupled activation of innate immune functions of blood MDCs in

viremic patients and that this phenomena is related in some measure to disease outcome (i.e. 100% of avireemics analyzed to date have normal MDC functions).

Defective TRIF-dependent sensing in CP-D patients can be restored by HCV antivirals. The high cVLs in CP-D patients (Table 6) combined with the fact that these patients showed reductions in their capacity to produce IL-12 and TNF- α upon TLR3 and TLR4 engagement but not TLR8 (Fig. 15), suggested that the attenuation of the response may result from the ability of NS3/4A to interfere with TRIF-coupled danger signal processing as reported in genotype 1b replicon lines (52). We were not able to isolate MDCs from HCV-infected patients in numbers that would have sufficed to conduct meaningful proteomic experiments to look for evidence of signaling alterations (i.e. TRIF cleavage). Therefore, in order to test the hypothesis that TLR3 and TLR4 inactivation here is due to interference with key signaling adapters within the TRIF-dependent pathway by the HCV NS3/4A protease, CP-D samples were pre-treated for 24 hours with BILN2061 NS3 protease (1 μ M; PI), VIR235 NS5B polymerase (10 μ M; PolI) antiviral inhibitors or vehicle alone (0.1% DMSO) prior to monitoring the cell response to LPS and 3M-002 by flow cytometry. Restoration of responsiveness following inhibition of HCV by specific viral inhibitors would indicate that TRIF-coupled signaling pathways were intact but suppressed by the virus. Representative data are shown in figure 16A. Stimulation of PBMCs with LPS in the presence of PI resulted in a twofold increase in the frequency of IL-12⁺TNF- α ⁺ effector MDCs as compared with LPS with vehicle control. For 9 out of 10 CP-D individuals tested, incubation of PBMCs with PI or PolI resulted in a significant increase in LPS-activated cytokine-producing MDCs compared to PBMCs incubated with vehicle control (P= 0.0054 and P= 0.0034, respectively; Fig. 16B), indicating that MDCs are functionally impaired, and that LPS innate sensing functions can be restored *ex vivo* following HCV inhibition. Moreover, these same cells did not see their ability to respond to 3M-002 change or their IL-6-producing frequencies increase for either agonists studied (Fig. 16C), confirming that HCV specifically blocks TRIF- but not MyD88-coupled cytokine induction and that IL-6 expression is refractory to inhibition, at least, as concerns TLRs.

The ability of BILN2061 to sensitize CP-D MDCs to respond to LPS as strongly as 3M-002 (compare middle pie-charts, Fig. 16C) argues in favour of the existence of a NS3 protease-dependent mechanism that inactivates TLR4-mediated cytokine-induction. However, Poll sensitized CP-D MDCs to the stimulatory effects of LPS to a similar degree (~2-fold) than cells exposed to BILN2061 (Fig. 16B,C), indicating that HCV can also inactivate TRIF-coupled TLRs by NS3 protease-independent processes. Upon exposure of PBMCs to PI or Poll, the response to LPS increased coincident with a dramatic decrease in the proportion of cVLs (Fig. 16A). Consistent with the above observation, there was a significant positive correlation between HCV inhibition and percentage of cytokine-expressing MDCs ($P=0.0032$; Fig. 16D). Thus, we consider that a threshold level of a virus-encoded antagonist(s) may have to be attained at the single-cell level to effectively blunt innate defense activation in the affected cells. We noted that antiviral inhibitors produced no significant enhancement of LPS-specific responses in CP-N subjects (not shown), in contrast with the significant enhancement seen in CP-D subjects, consistent with lower cVLs in the former. Altogether, these results demonstrate a relationship in CP-D patients between cVLs, impaired TRIF-dependent activity and abnormally weak IL-12 and TNF- α production in a proportion of MDCs producing IL-6. They also indicate that the attenuation of the response results from focused and reversible changes in downstream signaling events rather than global and unspecific dysfunctions in all MDCs.

Differences in the magnitude of HCV-specific CD8⁺ T cell responses between CP clusters do not influence viral persistence. The indistinguishable virologic outcome in the face of divergent MDC functionality raised the question as to whether the nature of the T cell memory/effector responses equally differed between the patients' CP clusters. Skewed activation and the failure of HCV-specific T cells to reach advance stages of differentiation after priming by dysfunctional DCs has been proposed as one reason for the inability of CD8⁺ T cells to contain HCV disease progression (11). To investigate if MDCs are associated with particular functional signatures of virus-specific CD8⁺ T cells in the context of HCV chronic infection, we

assessed HCV-specific CD8⁺ T cell responses in clustered CP-N (n=4) and CP-D (n=8) viremics by polychromatic flow cytometry. Six patients who received effective antiviral therapy and one subject (P31) able to spontaneously control infection, all with <50 copies of HCV RNA/ml serum (aviremic group), were also included for comparison (Table 7). We measured the frequency of HCV-specific CD8⁺ T cells by detection of intracellular IFN- γ , IL-2, and TNF- α production and surface CD107a mobilization (degranulation) after stimulation with consecutive, overlapping 18-mer peptide pools comprising complete NS3 and NS5B proteins. Limitations imposed by cell numbers allowed only NS3- and NS5B-specific CD8⁺ T cell responses to be assessed; these two non-structural proteins were selected due to the fact that they constitute immunodominant targets of HCV-specific immune responses irrespective of virologic outcome (76, 81). CMV-, EBV-, and flu (CEF)-specific CD8⁺ T cell responses were also analyzed in HCV-infected individuals by using a pool of 32 peptides (9-mers); this represented contained (immuno-controlled) infections. Consistent with previous findings, low frequencies of HCV-specific CD8⁺ memory T cells (cytokine⁺CD107a⁺), ranging from 0.01-0.07%, that targeted few regions of the two NS proteins tested (Fig. 17), were detectable in viremic CP-D patients. Surprisingly, we found significant differences between the frequencies observed in CP-N (0.13% \pm 0.02%) compared to CP-D (0.02% \pm 0.01%; P<0.001); none of the CP-D viremics showed frequencies that overlapped those in CP-N subjects (75% of which had \geq 0.10%; Fig. 17 and Table 7). High frequencies also persisted in the one untreated infected person with durable control of HCV replication (SR-P31, \approx 0.8% per protein tested; Table 7). These frequencies were much lower (0.02% \pm 0.01%; P<0.001) in subjects with therapy-mediated viral suppression (SVRs, <50 of HCV RNA copies/ml), as reported by others (71). Frequencies of CEF-specific CD8⁺ memory T cells in peripheral blood were not decreased in any of the groups; actually, proving higher in most patients than the responses seen against HCV (P= 0.0015 by Wilcoxon signed rank test; Table 7). We also explored whether CD8⁺ T cells that produced cytokines differed between patient groups by surface phenotypic markers. Among HCV-specific CD8⁺ T cells, the expression of CD27, CD45RO and PD-1 was highly heterogeneous, and we did not find distinct differences between patient groups

(data not shown). In Fig. 18B it can be appreciated that HCV-specific CD8⁺ T cells exclude naive cells (CD27⁺CD45RO⁻) and in general are CD27^{lo} and CD45RO⁺; phenotypically, CEF-specific CD8⁺ T cells are principally central memory (CD27⁺CD45RO⁺). Together, these findings indicated that qualitative rather than quantitative (magnitude and breadth) and phenotypic differences probably account for the decreased capacity of these patients to restrict HCV replication; differences in magnitude may not be all that relevant if all these CD8⁺ are functionally exhausted (e.g., impaired secretion of the survival cytokine IL-2) in vireemics, as previously reported (82).

Enhanced HCV-specific CD8⁺ T cell polyfunctionality in CP-N patients. To explore other factors than the magnitude that might affect CD8⁺ T cell-mediated control of HCV replication, we examined the simultaneous ability of virus-specific CD8⁺ T cells to secrete multiple cytokines and to degranulate. In humans and non-human primates, antigen-specific CD8⁺ T cell polyfunctionality represents a characteristic of effective and protective immune responses (2, 10, 14, 21, 30, 36). We therefore were expecting HCV-specific CD8⁺ T cell in vireemics to be exhausted (78) (i.e. cells expressing few functions), irrespective of the cluster grouping. Fig. 18A illustrates a typical multi-functional analysis of HCV-specific CD8⁺ T cells from an infected subject. CD8⁺ T cells specifically reactive with the peptide mixes responded by induction of IFN- γ , IL-2, TNF- α and/or CD107a. Negative controls indicated the extent of background activation, and these frequencies were subtracted from the peptide mix results to provide a net response frequency. Because this background subtraction is subject to stochastic fluctuation, we defined a positive net response for IFN- γ as $\geq 0.01\%$ for CD8⁺ T cells, based on statistical analysis of the responses of the HCV-seronegative donor cohort (see Materials and Methods). There were substantial frequencies of IFN- γ producing CD8⁺ T cells among NS3 pool 5 stimulated PBMCs (0.037% net responders per total CD8⁺ T cells; 0.056% of the CD8⁺ memory subset; see Fig. 18B for phenotype), which were not identified in the negative control stimulations. Simultaneous measurement of four functions allows detailed assessment of response quality. We compared the functional profiles,

irrespective of magnitude, by expressing each response component as a proportion of that total response. A detailed analysis of the HCV-specific CD8⁺ T cells revealed a heterogeneous functional profile (Fig. 18A bottom pie charts; each sector of the chart represents a subset expressing the marker depicted by the concentric colored arcs). The total response to NS3 was 0.07% of all memory CD8⁺ T cells and the dominant effector function was IFN- γ -production (\approx 79% of responding cells). Whereas about two thirds of responding CD8⁺ T cells produced TNF- α , degranulation (CD107a⁺) only accounted for \approx 13% of the total response; these CD8⁺ equally lacked IL-2 secretion (second panel from the left; Fig. 18A). The HCV-specific CD8⁺ T cells present in other CP-D chronics exhibited a similar functional profile: a blunted polyfunctional response pattern predominantly consisting of cells exhibiting 2 (2+, mainly IFN- γ ⁺ CD107a⁺) or fewer simultaneous functions and dominated by cells that only produced IFN- γ (single function, 1+; Fig. 18C). Aspects of this profile were also shared with HCV-specific CD8⁺ T cell responses in CP-N subjects despite differences in TLR potentials between these clusters. In fact, CP-N subjects were dominated by CD8⁺ that only degranulated (\approx 41%, <50% produced IFN- γ ; Fig. 18C). However, between clusters, these responses also displayed considerable functional complexity. In particular, we could not detect subsets of 3+ in most of the CP-D viremic patients in contrast to the cytokine functional capacities of CD8⁺ T cells from CP-N or avireemics (Fig. 18D). CP-N subjects also showed significantly higher proportions of 2+ cells ($P < 0.05$) as did avireemics ($P < 0.01$; Fig. 18D) compared to CP-D individuals. The presence of 4+ CD8⁺ T cells was also a discriminating factor between avireemics and vireemics.

Dual IFN- γ /IL-2-secreting T cells were largely absent in HCV-specific CD8⁺ T cells of vireemics, whereas they were found within CEF-specific CD8⁺ T cells. These observations were confirmed by the analysis of a large number of viremic subjects. A significant difference was found between the percentage of HCV-specific IFN- γ /IL-2-secreting CD8⁺ cells in chronically infected subjects to that found in the virus-specific IFN- γ /IL-2-secreting CD8⁺ T cells of the other virus infections (Fig. 18C). This was not restricted to responses to certain peptide pools, as IL-2 secreting CD8⁺ T

cells were not detected either for NS3 or NS5B, nor was it a generalized intrinsic cellular defect as CD8⁺ T cells of vireemics were able to produce IL-2 after SEB stimulation, thus indicating a selective loss of HCV-specific functions (not shown). However, surprisingly, CP-N had detectable IFN- γ /IL-2-secreting (2+) CD8⁺ cells (3% \pm 1% of the total response, n=4). We also evaluated the proportion of IL-2-secreting CD8⁺ within the total CD8⁺ response to NS3 or NS5B antigens. Cumulative data of this analysis are shown in Fig. 18E. The proportion of CEF-specific (43.2% \pm 4.2%) was significantly higher compared with that of HCV-specific IL-2-secreting CD8⁺ T cells (P<0.001) of vireemics. The evaluation of the presence of IL-2-secreting CD8⁺ T cells in six representative avireemics showed that a substantial percentage of IL-2-secreting cells was also found after stimulation with HCV peptide pools (17.6% \pm 3.9%; Fig. 18); this was significantly different (P=0.02) compared with vireemics (7.1% \pm 1.8%, n=9), although there was an overlap in IL-2 production between CP-N and avireemics, with more heterogeneity among the latter. These data show that IL-2-secretion in HCV-specific CD8⁺ T cells is partially restored when TLRs are functional, but that normalization of IL-2 expression is incomplete or very slow even in the presence of seemingly effective TLRs. They also demonstrate that the response hierarchy of CD8⁺ in viremic subjects was limited (compared to immuno-controlled infections), with the major responding populations being mainly segregated to few of the possible functional combinations, most with 2 or fewer simultaneous functions, driven primarily by a paucity of IL-2 production. Nevertheless, the response of CP-N viremic subjects (with functional TLRs) was notably shifted in functionality, such that cells positive for 3+ functions were detectable. This three-functional response to NS3 and NS5B was confined to a particular combination of functional parameters (production of IFN- γ , TNF- α and IL-2 production in the absence of CD107a mobilization) while other 3+ combinations were rarely elicited. Although causality can not be demonstrated in these studies, the results strongly suggest that TLRs are sufficient to alter the quality of HCV-specific CD8⁺ T cells (CP-N have a gain in polyfunctionality), but that other mechanisms must be implicated in controlling the effector potential of these CD8⁺ cells in chronic infection (see below).

PD-L1 expression and MDC functionality are associated with distinct defects in HCV-specific CD8⁺ T cell responses. Recent data indicate that the PD-1/PD-L1 ligand pathway plays a role in HCV-specific T cell exhaustion, with high levels of PD-1 recognized as a signature of CD8⁺ T cells with impaired proliferative capacity and lack of viral control (28). PD-L1 is expressed on both monocytes and MDCs (66), and is sharply induced in patients upon TLR activation along with CD86/CCR7 (data not shown). To define the potential function of this immunoregulatory pathway in maintaining persistent infection in viremic subjects, independently of functional TLRs (Fig. 15) and reemergence (or preservation) of polyfunctional CD8⁺ T cells (Fig. 18), we first did a comparative longitudinal analysis of PD-L1 expression on resting MDCs between viremic clusters. PD-L1 expression was readily apparent on these cells irrespective of CP cluster affiliation (9.3% ± 1.2% vs. 10.9% ± 1.1%), and was significantly higher than in avireemics (5.4% ± 1.1%, P= 0.0205 and P= 0.0176, vs. CP-N and CP-D respectively; Table 6). In addition to a higher proportion (~2-fold) of MDCs expressing PD-L1 in the periphery of viremic subjects than avireemics, those that express PD-L1, exhibit increased levels of surface expression (MFI) of this immunoregulatory ligand throughout the time period analyzed (Fig. 19), indicating a relationship between ongoing antigen exposure (viremia) and surface PD-L1 expression. In turn, significantly less PD-L1 was expressed on MDCs of HCV-seronegative individuals compared with viremic's MDCs (P< 0.01; Fig. 19B). High PD-L1 expression on resting MDCs of viremic subjects was unique as we did not see upregulation of CD86 or CCR7 (data not shown), consistent with previous reports.

Next, we examined the relationship between virus-specific CD8⁺ T cells and PD-L1 expression, cVL and LPS responsiveness (log₂ fold-change) -the latter two being predictors of MDC functionality in the HCV-seropositive subjects. There was no correlation between the frequency of IFN-γ⁺ HCV-specific CD8⁺ T cells and PD-L1 expression (Fig. 20A); PD-L1 expression in MDCs correlated inversely with a quantitative increase in the number of HCV-specific cytokine-producing, degranulating CD8⁺ T cells (P< 0.0001; Fig. 20B); and the ability of CD8⁺ T cells to produce IL-2 in response to either NS3 or NS5B correlated inversely with the cVL

($P= 0.01$; Fig. 20D) and positively with LPS-induced \log_2 fold-change in cytokine expression by MDCs ($P= 0.008$; Fig. 20E), but not with PD-L1 expression (data not shown). Unlike HCV, responder frequencies as well as IL-2 secretion by CEF-specific $CD8^+$ T cells did not correlate with either PD-L1 or predictors of MDC functionality in HCV-seropositive subjects, providing evidence that selective impairment of MDCs by HCV leads to pathogen-specific immunoregulation (Fig. 20). We found no correlation between the frequency of HCV-specific $CD8^+$ T cells in patients and cVL (data not shown). Thus, we did not find differences between clustered patients and avireemics in the ability of HCV-specific $CD8^+$ T cells to activate and produce IFN- γ in response to NS3 and NS5B peptide pools (Fig. 20C). Taken together, these results suggest that the incapacitated functionality profiles observed for HCV-specific $CD8^+$ T cells in chronic infection are, in part, causally related to direct HCV-mediated impairment of TLR-dependent activation of MDCs. This is consistent with published reports that PD-1/PD-L1 blockade results in quantitative increases in the number of antigen-specific cytokine-producing $CD8^+$ T cells in chronic infections, without any significant qualitative shift in the cytokine profile of the responding cells (42, 66, 67); a role that is ascribed to functional MDCs in this study. These data also indicate that increasing levels of antigenaemia in HCV infection result in immunoregulatory signals mediated through PD-1/PD-L1 that impair T cell function, providing a mechanism to explain the inability of HCV-specific cellular immune responses in CP-N to effectively control viremia, despite functional MDCs.

DISCUSSION

The goal of this work was to decipher the mechanistic basis underlying the HCV-associated innate sensing defect of peripheral MDCs and to comprehend how MDC functionality translates at the level of the adaptive immune response in chronic HCV disease. Primary failure to induce a T cell response or functional exhaustion of an initially vigorous response predict viral persistence (79). However, the basis for variable immunological responsiveness to HCV has largely remained elusive. An emerging theme in innate immunity postulates that DCs play a critical role in sensing

pathogens, either directly (via pathogen recognition receptors [PRRs]) or indirectly (inflammatory cytokines), and integrating this information to regulate the quantity, and quality of the adaptive immune response (69). HCV seems to be resistant to innate immune antiviral pathways, at least in hepatocytes, and several structural and nonstructural proteins have been shown to inhibit overlapping functions of the innate immune response (29). Therefore, we addressed two questions. Firstly, were blood MDCs cellular targets of HCV evasion by the NS3/4A protease which actively interferes with TLR3-dependent phosphorylation and effector action of IRF3 (26) through proteolytic degradation of TRIF (52). Secondly, whether virus-induced evasion of TRIF-dependent activation of innate immunity at the MDC level could participate, in part, in the failure of HCV-specific CD8⁺ T cell immunity to control infection. The role that TLR3 plays in activation of innate immunity may not be in recognizing exogenous naked dsRNA, which is unlikely to be found as a free-floating species in the extracellular milieu; rather, TLR3 might act in recognizing incoming viruses which have intrastrand hybridization as noted for HCV (85) or, through autophagy, it might recognize dsRNA produced by viruses replicating in the cytosol. Recently described by Lee *et al.* (49), autophagy is an unexpected role for endosomal TLR recognition in viral infection, whereby autophagy in plasmacytoid DCs (PDC) allows capture of VSV RNA replication intermediates from the cytosol and recognition of the latter via TLR7. Therefore, through autophagosomes, endosomal TLRs are no longer restricted to sampling the extracellular compartment and can contribute to cytosolic recognition of viruses, such as HCV, that evade RIG-I/IPS-1-dependent pathways. An additional scenario in which TLR3 has been implicated is in the recognition by DCs of phagocytosed virus-infected cells containing dsRNA (75). Given these abilities, HCV may have an advantage in exerting direct pressure on human TLR3 functions to drive its maintenance in any phase of the infection.

Through the use of multiparametric flow cytometry, unsupervised hierarchical clustering algorithms and longitudinal analyses, we clearly observed that MDCs from a subgroup of viremic patients (CP-D) exhibit defective TRIF-dependent danger sensing activities and maintain intact MyD88-coupled functions (Fig. 15). For instance, HCV-P50 contained a subpopulation of MDCs that were only unresponsive

to TRIF-dependent TLR agonists as compared with HCV-P55 who preserved responses to all agonists. Arguably, some of the past difficulties in demonstrating this phenomenon convincingly stemmed from the use of *in vitro* cytokine-driven culture systems that gave rise to CD14⁺ monocyte-derived DCs (54) instead of studying primary DCs directly, and from the failure of the majority of those studies that do analyze the latter cells to test the extent of activation of DCs in response to innate inputs known to signal through PRRs dedicated to sensing viral products (55). We found that chemically diverse small-molecule HCV inhibitors (Table 6) could restore TRIF-dependent signaling to LPS coincident with reductions in cVLs. Addition of an inhibitor of HCV, such as BILN2061 (47), would be expected to overcome HCV-dependent attenuation of TLRs in MDCs, reverse this phenotype, and enable greater than normal cytokine induction, as we frequently observed (Fig. 16), but only if TRIF-coupled signaling pathways were intact and specifically suppressed by the virus. Even though we are aware of the fact that sensitivity to BILN2061 treatment does not necessarily equate with TRIF cleavage and degradation, our data supports the existence of NS3-dependent mechanisms that either target TRIF itself or components of the signaling pathway downstream of TRIF and upstream of TBK-1/IKKε in MDCs, because all known signaling element downstream of MyD88 appear intact. However, this does not exclude the possibility that other mechanisms independent of NS3/4A protease activity are also involved. In addition to revealing the outlines of the pathogenic mechanism at play, this part of our study provided conclusive evidence that specific PRRs are disabled by direct virus-host interactions between HCV and DCs.

The biologic importance of the above findings is underscored by the observation that TRIF-dependent TLR responses of MDCs correlated positively with the quality of HCV-restricted CD8⁺ T cells (as measured by the number of effector functions, including IL-2 secretion) and not with CD8⁺ specific for other viruses (Fig. 20), in accordance with the narrow range of immune disorders documented in such patients (11). The fact that CEF-specific CTL responses were induced normally in viremic subjects (Fig. 18) clearly shows that the phenomenon we observed is genuine antigen-specific CD8⁺ functional exhaustion mediated in part by the ability of HCV

to directly inactivate specific components of innate immunity in MDCs. This is in line with data published by others demonstrating that antigen presentation by inactive DCs results in silencing or abortive activation of antigen-specific CD8⁺ effector functions in the responding T cells (18). Polymorphisms in TLR7 were recently reported to impact the clinical course of HCV infection, further suggesting a link between the innate immune system and chronic disease pathogenesis (74). Collectively, these data strongly argue that potent polyfunctional CD8⁺ T cell responses directed at HCV are causally related to the complete or near complete restoration of MDC innate responsiveness in at least some viremic patients. It should be emphasized, however, that by necessity the data is correlative in nature, making it difficult to exclude the possibility that the preservation of potent MDC responses are a consequence rather than a cause of polyfunctional HCV-specific CD8⁺ responses. In any event, DCs that can sense pathogens represent an important nodal point in which pathogen-associated signals are integrated and transmitted to the adaptive immune system (46).

Although it is clear from this study and others (4, 5, 17, 72) that attenuation of MDC innate sensing occurs in HCV infection, the relevance of this mechanism to viral persistence is an open question. The cell-specific and numerically restrained MDC defect described here offered a promising opportunity with which to investigate and reconcile defects in DC-mediated innate immune functions with the HCV-restricted nature of the deficit in cellular immunity. One major criticism of the dysfunctional DC hypothesis in explaining the loss of effective HCV-specific T cells observed in subjects who go on to develop chronic disease has been the assumption that viral persistence would require the infection of a significant percentage of DCs *in vivo* and that this would invariably lead to generalized immunosuppression (20). Recently, direct recognition of pathogen-specific molecules (which are usually covalently associated with the antigen from which they derive) by TLRs expressed on DCs rather than DC activation induced indirectly by inflammatory cytokines (e.g., TNF- α) has been shown to be required for induction of full effector T cell memory function *in vivo* (63, 83). In the latter case, preactivation of DCs that have not yet encountered the pathogen abrogates their participation to antigen presentation by primarily down-

regulating both cross-presentation (90) and formation of new MHC-II-peptide complexes (92). In the scenario of HCV infection, inactivation of TRIF-dependent TLRs on MDCs by physical interactions with the virus should have no deleterious consequences to global immune homeostasis because the number of circulating MDCs that respond to a given pathogen (i.e. likely to present viral antigens) is probably small if we consider that any MDCs presenting HCV antigens will have to have first been in contact with pathogen components; in this model, maintenance of virus-specific functional responses would be contingent on proper processing and delivery of danger signals by DCs presenting HCV antigens. Because our results also demonstrate that HCV-altered MDCs are fully able to express IL-12 and TNF- α in response to stimulation with MyD88-dependent TLR agonists, dysfunctional MDCs within the periphery of viremic patients could continue to contribute to protective immunity to other viruses by their intact MyD88-dependent signaling pathway, even if they are not the originating source for the presented antigens. Therefore, each pathogen encounter leaves probably enough DCs ready to respond in the periphery to subsequent challenges to new infections. In addition, plasmacytoid DCs (PDC) prove to be an ineffectual viral host for HCV, remaining functional in chronically infected patients (16), in stark contrast with MDCs. PDCs are not essential for initiating immune responses but are specialized in modulating the strength, duration and quality of the responses that have been activated by MDCs (53). Thus, the ability of PDCs to expand antigen-specific memory (25), while remaining less efficient than MDCs in priming antigen-specific naive T cells (3, 73), provides a supplementary explanation for the preservation of recall (memory) responses to other viruses (e.g., influenza virus, CMV, etc.) observed in chronically infected individuals. We propose that the physiological consequences of the interaction between HCV and MDCs on T cell activation as surmised above are not in contradiction with the immunologic data demonstrating that the deficit in the immune repertoire of chronically infected patients is HCV-restricted.

The finding that CP-N and CP-D patients had similar virological outcomes but differed in their MDC functionality potential and CD8⁺ T cell response quality may initially seem counterintuitive. Nonetheless, the incompleteness of defects in DC-

mediated innate immune functions to account fully for chronicity is not inconsistent with the assumption that multiple factors may synergize to affect persistence, including human immunoregulatory genes such as PD-L1/PD-1. PD-1 is a negative regulator of apoptosis sensitivity that can impact the frequency of antiviral T cells in HIV infection (66), and could be manipulated to improve virus-specific CD8⁺ T cell numbers, but possibly not all functions *in vivo*. Indeed, following initiation of anti-retroviral therapy, PD-1 expression decreases on HIV-specific CD8⁺ T cells (15, 86), but this downregulation does not directly improve functionality of pre-existing virus-specific CD8⁺ (10). PD-L1 up-regulation on APCs (Fig. 19) correlates with decreases in the number of antigen-specific HCV-specific CD8⁺ T cells detected, but appears to have only a marginal effect on their effector functional capacities during chronic infection (Fig. 20); instead, significant qualitative shifts in the functional profiles of HCV-specific CD8⁺ are intertwined with the presence of functional MDCs. Although speculative, these data, when combined with the observation that the major effect of PD-1 blockade in mice and non-human primates was on antigen-specific CD8⁺ T cell proliferation (7, 67), indicate that cell cycle dysregulation by PD-1/PD-L1 may limit antiviral effectiveness of polyfunctional HCV-specific CD8⁺ T cell responses by diminishing their clonal expansion potential as is the case for HIV (61). This also suggests a role for TLR evasion in the genesis of chronic infection rather than its maintenance, consistent with our observations that a CP-N phenotype with high PD-L1 expression can co-exist with chronic viremia (Table 6). It is notable that once established, PD-L1 expression and impaired TLR responses tend to remain fixed within the circulating MDCs of an individual. The cause of the variability in MDC function between viremic patients remains to be determined and may well be governed largely by the stochastic nature of viral quasispecies evolution that generates NS3/4A protease with different catalytic efficiencies (27). Differences in kinetics of immune responses might also be involved in the variable dynamics of MDC dysfunctions. For example, PD-1 has a component of its expression that is regulated by increasing levels of antigenaemia (41, 88); virulence factors that accelerate the viral set-point in a host probably dictate how quickly PD-1/PD-L1 conditioning of HCV antigen-specific T cells is established, which may lead to

release from early immune selection pressure, obviating any advantage of HCV variants with altered cellular tropism to be retained within non-hepatocyte cells. Future prospective study of acute and evolving HCV infection as well as factors such as the temporal relationship between the emergence of impaired MDCs, PD-1 imprinting and persistence of a HCV-specific CD4⁺ T-helper cell response, already demonstrated as important in disease resolution (33, 81), might not only further elucidate the role for DCs in fighting off the infection, but also strengthen the proposed role for virus evasion of PRRs in creating an environment conducive to viral persistence. This is work needed to delineate the function DCs play in HCV persistence, as well as to define more clearly the roles of both PRR inactivation and PD-1/PD-L1 in governing viral persistence in chronic disease. In particular, careful dissection of these factors will be critical to the design of any effective therapeutic-based vaccine as it appears that there are "layers" of regulation in place to limit the responsiveness of virus-specific T cells during chronic infection.

HCV-specific CD8⁺ memory T cells in peripheral blood were either undetectable or detectable at only very low frequencies in aviremic subjects with therapy-mediated viral suppression (SVRs; Fig. 17). These frequencies, as a group, were significantly less than those observed in otherwise TLR functional subjects with active disease (CP-N). Although this observation was cross-sectional rather than prospective, the profound differences between the two groups (mean frequencies, 0.13% ±0.02% and 0.02% ±0.01%; 75% and 20% with frequencies ≥0.1, CP-N and SVRs respectively) and the degree of statistical significance (P<0.01) strongly support the conclusion that HCV-specific CD8⁺ T cells are progressively lost from the recirculating memory pool with prolonged viral suppression. Of course, we cannot infer from these results that HCV-specific CD8⁺ memory is lost after effective therapy-induced control of viremia, but that it probably merely falls below the detection-threshold of this flow cytometry assay. The present study argues that in the absence of constant antigenic challenge, HCV-specific memory slowly decays because they lose their competitive advantage and are consequently diluted by memory T cells specific for other (non persistent) antigens; the general microenvironmental changes after viral suppression

would be coupled with a profound decrease in overall tissue concentrations of cognate antigen and this would render these T cells particularly vulnerable to replacement by other memory T cell specificities. Availability and exposure to antigen is one of the most potent influences on memory T clonotype competition (34, 44), with virus-specific clonotypes directed to chronic infections (persistent antigens) needing periodical or continuous stimulation by their specific antigen to maintain their numbers stable (89) and gain a competitive advantage over the self-renewing, antigen-independent pool of memory CD8⁺ T cells that arise following acute control of infections. Similar decreases in HCV-specific CD8⁺ T cells have been reported after therapy (12, 48, 71), probably because of the same homeostatic considerations discussed here. Such decline in HCV-specific immunity when the antigen is removed by antivirals might be a contributing factor to the rapid resumption of viral replication in therapy-failing subjects. HCV-specific CD8⁺ T cells of high functional quality (IL-2⁺) could manage to survive during therapy in CP-N subjects during the period in which the main reservoir of infectious (and antigenic) virus decreases, thus tipping the balance in favor of the host against the virus; to respond quickly to situations of viral rebound and escape after transient periods of control, or to eliminate the virus completely, high levels of pre-existing polyfunctional HCV-specific memory CD8⁺ T cells are likely required (6, 80). Thus, the CP-N status of some HCV-infected subjects may well reflect an ability to respond better to IFN- α_2 therapy. This prediction is supported by the remarkable effectiveness and rapidity with which 4 out of 5 CP-N patients receiving IFN- α_2 therapy suppressed their viremia in contrast to CP-D subjects, a majority of whom invariably failed treatment (Table 8 and unpublished data). P55, who achieved successful control of viremia with IFN- α_2 antiviral therapy, showed a strongly dominant CD8⁺ four (4+)-functional NS5B-specific T cell response. Similarly, two aviremics had 4+ cells (Table 7). However, these three cross-sectional anecdotal cases are insufficient to allow an analysis of the functionality of the CD8⁺ T cell/MDC response and subsequent immunological and virological control of HCV infection. These are hypotheses that we are now experimentally addressing as they may hold important therapeutic implications.

Collectively, our results suggest that compounds like BILN2061 may have dual therapeutic mechanisms, both suppressing HCV replication and preventing polyprotein processing (47, 58), while concomitantly releasing the host's MDC response from the blockade imposed by NS3/4A interference with TRIF- (and possibly IPS-1)-dependent pathways. It is notable that MDCs of CP-D clustered viremic individuals were unable to induce cytokines to transfected full-length HCV genomic RNAs as compared to all other groups tested (unpublished data). In the context of IFN- α_2 therapy of HCV infection (which is only effective in $\leq 50\%$ of patients), IPS-1 cleavage by NS3/4A likely attenuates the RNaseL/RIG-I amplification loop that increases the level and diversity of ISGs induced by IFN signaling and that cells use to inhibit HCV infection (57). Such a mechanism probably limits the efficacy of IFN-based therapies in restoring innate immune functions of MDCs. Targeting of the NS3/4A-IPS-1 interface by protease inhibitors (with the end result being akin to a CP-N phenotype) may therefore enhance IFN actions in patients failing treatment by augmenting both microbial innate immunity and T cell responses to HCV. To conclude, a central theme of this study is that critical parameters of the MDC innate immune system that exert a profound influence on the strength and quality of T cell responses are targets of HCV evasion strategies. In this context, the precise roles played by individual TLRs or, indeed, the growing list of non-TLR PRRs, such as RIG-I, in the induction of long-term protective T cell responses and memory is an area that must be explored further.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out as a partial fulfillment of I.G.R.-G.'s PhD thesis at Université de Montréal. We thank P. Melançon for technical assistance; L. Montcalm and Marie-Lynn Carron for patient care; Virochem Pharma for BILN2061 and the polymerase antiviral inhibitor VIR235; J. Vasilakos of 3M Pharmaceuticals for the imidazoquinoline compounds 3M-002 and 3M-011; D. Murphy for plasma HCV quantitation studies; and N. Shoukry and O. Yegorov for discussions. Funded by grant MOP-79546 from CIHR and the Novartis/Canadian Liver Foundation (D.L.). I.G.R.-G. is a recipient of an INSERM U743 doctoral scholarship and L.J. of a Canadian Liver Foundation doctoral scholarship.

REFERENCES

1. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-738.
2. Almeida, J. R., D. A. Price, L. Papagno, Z. A. Arkoub, D. Sauce, E. Bornstein, T. E. Asher, A. Samri, A. Schnuriger, I. Theodorou, D. Costagliola, C. Rouzioux, H. Agut, A. G. Marcelin, D. Douek, B. Autran, and V. Appay. 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8⁺ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *Journal of Experimental Medicine* **204**:2473-2485.
3. Angelov, G. S., M. Tomkowiak, A. Marçais, Y. Leverrier, and J. Marvel. 2005. Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo. *Journal of Immunology* **175**:189-195.
4. Anthony, D. D., N. L. Yonkers, A. B. Post, R. Asaad, F. P. Heinzl, M. M. Lederman, P. V. Lehmann, and H. Valdez. 2004. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *The Journal of Immunology* **172**: 4907-16.
5. Averill, L., W. M. Lee, and N. J. Karandikar. 2007. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection. *Clinical Immunology* **123**:40-9.
6. Barber, D. L., E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2003. Rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. *Journal of Immunology* **171**:27-31.
7. Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**:682-687.
8. Bell, J. K., J. Askins, P. R. Hall, D. R. Davies, and D. M. Segal. 2006. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**(23):8792-7:8792-8797.

9. **Betts, M. R., J. M. Brenchley, D. A. Price, S. C. De Rosa, D. C. Douek, M. Roederer, and R. A. Koup.** 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods* **281**:65-78.
10. **Betts, M. R., M. C. Nason, S. M. West, S. C. De Rosa, S. A. Migueles, J. Abraham, M. M. Lederman, J. M. Benito, P. A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer, and R. A. Koup.** 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* **107**:4781-4789.
11. **Bowen, D. G., and C. M. Walker.** 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* **436**:946-952.
12. **Chang, K. M., R. Thimme, J. J. Melpolder, D. Oldach, J. Pemberton, J. Moorhead-Loudis, J. G. McHutchison, H. J. Alter, and F. V. Chisari.** 2001. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* **33**:267-276.
13. **Choe, J., M. S. Kelker, and I. A. Wilson.** 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309(5734)**:581-585.
14. **Darrah, P. A., D. T. Patel, P. M. De Luca, R. W. Lindsay, D. F. Davey, B. J. Flynn, S. T. Hoff, P. Andersen, S. G. Reed, S. L. Morris, M. Roederer, and R. A. Seder.** 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature Medicine* **13**:843-850.
15. **Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B. D. Walker.** 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**:350-354.
16. **Decalf, J., S. Fernandes, R. Longman, M. Ahloulay, F. Audat, F. Lefrerre, C. M. Rice, S. Pol, and M. L. Albert.** 2007. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *Journal of Experimental Medicine* **204**:2423-37.
17. **Della Bella, S., A. Crosignani, A. Riva, P. Presicce, A. Benetti, R. Longhi, M. Podda, and M. L. Villa.** 2007. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4⁺ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology* **121**:283-92.
18. **Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, and N. Bhardwaj.** 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **193**:233-238.
19. **Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa.** 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303(5663)**:1529-31:1529-1531.
20. **Dustin, L. B., and C. M. Rice.** 2007. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annual Reviews in Immunology* **25**:71-99.
21. **Duvall, M. G., M. L. Precopio, D. A. Ambrozak, A. Jaye, A. J. McMichael, H. C. Whittle, M. Roederer, S. L. Rowland-Jones, and R. A. Koup.** 2008. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *European Journal of Immunology* **38**:350-3563.

22. **Ferreon, J. C., A. C. Ferreon, K. Li, and S. M. Lemon.** 2005. Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *Journal of Biological Chemistry*.
23. **Finlay, B. B., and G. McFadden.** 2006. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* **124**:767-782.
24. **Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock.** 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *Journal of Experimental Medicine* **198(7)**:1043-55:1043-1055.
25. **Fonteneau, J. F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Münz, Y. J. Liu, and N. Bhardwaj.** 2003. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* **101**:3520-3426.
26. **Foy, E., K. Li, C. Wang, R. Sumpter, M. Ikeda, S. M. Lemon, and M. Gale.** 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* **300**:1145-8.
27. **Franco, S., M. Parera, E. Aparicio, B. Clotet, and M. A. Martinez.** 2007. Genetic and catalytic efficiency structure of an HCV protease quasispecies. *Hepatology* **45**:899-910.
28. **Freeman, G. J., E. J. Wherry, R. Ahmed, and A. H. Sharpe.** 2006. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *Journal of Experimental Medicine* **203**:2223-2227.
29. **Gale, M., and E. M. Foy.** 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* **436**:939-945.
30. **Genescà, M., T. Rourke, J. Li, K. Bost, B. Chohan, M. B. McChesney, and C. J. Miller.** 2007. Live attenuated lentivirus infection elicits polyfunctional simian immunodeficiency virus Gag-specific CD8+ T cells with reduced apoptotic susceptibility in rhesus macaques that control virus replication after challenge with pathogenic SIVmac239. *Journal of Immunology* **179**:4732-4740.
31. **Golden-Mason, L., B. Palmer, J. Klarquist, J. A. Mengshol, N. Castelblanco, and H. R. Rosen.** 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *Journal of Virology* **81**:9249-9258.
32. **Gorden, K. B., K. S. Gorski, S. J. Gibson, R. M. Kedl, W. C. Kieper, X. Qiu, M. A. Tomai, S. S. Alkan, and J. P. Vasilakos.** 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of Immunology* **174**:1259-1268.
33. **Grakoui, A., N. H. Shoukry, D. J. Woollard, J. H. Han, H. L. Hanson, J. Ghayeb, K. K. Murthy, C. M. Rice, and C. M. Walker.** 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**:659-62.
34. **Gray, D.** 2002. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nature Review Immunology* **2**:60-65.
35. **Guggemoos, S., D. Hangel, S. Hamm, A. Heit, S. Bauer, and H. Adler.** 2008. TLR9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *Journal of Immunology* **180**:438-443.
36. **Harari, A., C. Cellerai, F. B. Enders, J. Köstler, L. Codarri, G. Tapia, O. Boyman, E. Castro, S. Gaudieri, I. James, M. John, R. Wagner, S. Mallal, and**

- G. Pantaleo.** 2007. Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**:16233-16238.
37. **Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer.** 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303(5663)**:1526-9:1526-1529.
38. **Irish, J. M., R. Hovland, P. O. Krutzik, O. D. Perez, O. Bruserud, B. T. Gjertsen, and G. P. Nolan.** 2004. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell* **118**:217-228.
39. **Irish, J. M., N. Kotecha, and G. P. Nolan.** 2006. Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics. *Nature Review Cancer* **6**:146-155.
40. **Johnson, C. L., D. M. Owen, and M. Gale.** 2007. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. *Journal of Biological Chemistry* **282**:10792-10803.
41. **Kasproicz, V., J. Schulze Zur Wiesch, T. Kuntzen, B. E. Nolan, S. Longworth, A. Berical, J. Blum, C. McMahon, L. L. Reyor, N. Elias, W. W. Kwok, B. G. McGovern, G. Freeman, R. T. Chung, P. Klenerman, L. Lewis-Ximenez, B. D. Walker, T. M. Allen, A. Y. Kim, and G. M. Lauer.** 2007. High PD-1 expression on HCV-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute Hepatitis C irrespective of clinical outcome. *Journal of Virology* doi:10.1128/JVI.02474-07.
42. **Kaufmann, D. E., D. G. Kavanagh, F. Pereyra, J. J. Zaunders, E. W. Mackey, T. Miura, S. Palmer, M. Brockman, A. Rathod, A. Piechocka-Trocha, B. Baker, B. Zhu, S. Le Gall, M. T. Waring, R. Ahern, K. Moss, A. D. Kelleher, J. M. Coffin, G. J. Freeman, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker.** 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature Immunology* **8**:1246-1254.
43. **Kawai, T., and S. Akira.** 2007. TLR signaling. *Seminars of Immunology* **19**:24-32.
44. **Kedl, R. M., W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Murrack.** 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *Journal of Experimental Medicine* **192**:1105-1113.
45. **Kittlesen, D. J., K. A. Chianese-Bullock, Z. Q. Yao, T. J. Braciale, and Y. S. Hahn.** 2000. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *Journal of Clinical Investigation* **106**:1239-1249.
46. **Kwissa, M., R. R. Amara, H. L. Robinson, B. Moss, S. Alkan, A. Jabbar, F. Villinger, and B. Pulendran.** 2007. Adjuvanting a DNA vaccine with a TLR9 ligand plus Flt3 ligand results in enhanced cellular immunity against the simian immunodeficiency virus. *Journal of Experimental Medicine* **204**:2733-2746.
47. **Lamarre, D., P. C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bös, D. R. Cameron, M. Cartier, M. G. Cordingley, A. M. Faucher, N. Goudreau, S. H. Kawai, G. Kukulj, L. Lagacé, S. R. LaPlante, H. Narjes, M. A. Poupard, J. Rancourt, R. E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y. S. Tsantrizos, S. M. Weldon, C. L. Yong, and M. Llinàs-Brunet.**

2003. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **426**:186-189.
48. 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. *Journal of Virology* **79(20)**:12979-88:12979-12988.
49. Lee, H. K., J. M. Lund, B. Ramanathan, N. Mizushima, and A. Iwasaki. 2007. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315**:1398-1401.
50. Lee, J., C. C. Wu, K. J. Lee, T. H. Chuang, K. Katakura, Y. T. Liu, M. Chan, R. Tawatao, M. Chung, C. Shen, H. B. Cottam, M. M. Lai, E. Raz, and D. A. Carson. 2006. Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**:1828-1833.
51. Lee, M. S., and Y. J. Kim. 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual Review Biochemistry* **76**:447-480.
52. Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, and S. M. Lemon. 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102**:2992-7.
53. Liu, Y. J. 2004. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology*.
54. Longman, R. S., A. H. Talal, I. M. Jacobson, M. L. Albert, and C. M. Rice. 2004. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* **103**:1026-1029.
55. Longman, R. S., A. H. Talal, I. M. Jacobson, C. M. Rice, and M. L. Albert. 2005. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Infectious Disease* **192**:497-503:497-503.
56. Loo, Y. M., D. M. Owen, K. Li, A. K. Erickson, C. L. Johnson, P. M. Fish, D. S. Carney, T. Wang, H. Ishida, M. Yoneyama, T. Fujita, T. Saito, W. M. Lee, C. H. Hagedorn, D. T. Lau, S. A. Weinman, S. M. Lemon, and M. Gale. 2006. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**:6001-6006.
57. Malathi, K., B. Dong, M. Gale, and R. H. Silverman. 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**:816-819.
58. Manns, M. P., G. R. Foster, J. K. Rockstroh, S. Zeuzem, F. Zoulim, and M. Houghton. 2007. The way forward in HCV treatment - finding the right path. *Nature Review Drug Discovery* **6**:991-1000.
59. Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**:1167-1172.
60. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**:39-44.
61. Migueles, S. A., A. C. Laborico, W. L. Shupert, M. S. Sabbaghian, R. Rabin, C. W. Hallahan, D. Van Baarle, S. Kostense, F. Miedema, M. McLaughlin, L. Ehler, J. Metcalf, S. Liu, and M. Connors. 2002. HIV-specific CD8⁺ T cell

proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature Immunology* **3**:1061-1068.

62. **Moradpour, D., F. Penin, and C. M. Rice.** 2007. Replication of Hepatitis C virus. *Nature Review Microbiology* **6**:453-463.

63. **Nolte, M. A., S. Leibundgut-Landmann, O. Joffre, and C. Reis e Sousa.** 2007. Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1487-1501.

64. **O'Neill, L. A., and A. G. Bowie.** 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Review Immunology* **7**:353-364.

65. **Perfetto, S. P., P. K. Chattopadhyay, L. Lamoreaux, R. Nguyen, D. Ambrozak, R. A. Koup, and M. Roederer.** 2006. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **313**:199-208.

66. **Petrovas, C., J. P. Casazza, J. M. Brenchley, D. A. Price, E. Gostick, W. C. Adams, M. L. Precopio, T. Schacker, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup.** 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *Journal of Experimental Medicine* **203**:2281-2292.

67. **Petrovas, C., D. A. Price, J. Mattapallil, D. R. Ambrozak, C. Geldmacher, V. Cecchinato, M. Vaccari, E. Tryniszewska, E. Gostick, M. Roederer, D. C. Douek, S. H. Morgan, S. J. Davis, G. Franchini, and R. A. Koup.** 2007. SIV-specific CD8+ T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection. *Blood* **110**:928-936.

68. **Pichlmair, A., and C. Reis e Sousa.** 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity* **27**:370-383.

69. **Pulendran, B., and R. Ahmed.** 2006. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**:849-863.

70. **Radziewicz, H., C. C. Ibegbu, M. L. Fernandez, K. A. Workowski, K. Obideen, M. Wehbi, H. L. Hanson, J. P. Steinberg, D. Masopust, E. J. Wherry, J. D. Altman, B. T. Rouse, G. J. Freeman, R. Ahmed, and A. Grakoui.** 2007. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *Journal of Virology* **81**:2545-2553.

71. **Rahman, F., T. Heller, Y. Sobao, E. Mizukoshi, M. Nascimbeni, H. Alter, S. Herrine, J. Hoofnagle, T. J. Liang, and B. Rehermann.** 2004. Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C. *Hepatology* **40**:87-97.

72. **Rodrigue-Gervais, I. G., L. Jouan, G. Beaulé, D. Sauvé, J. Bruneau, B. Willems, R. P. Sékaly, and D. Lamarre.** 2007. Poly(I:C) and LPS innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in Hepatitis C virus-infected patients. *Journal of Virology* **81**:5537-46.

73. **Sapozhnikov, A., J. A. Fischer, T. Zaft, R. Krauthgamer, A. Dzionek, and S. Jung.** 2007. Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1923-1933.

74. **Schott, E., H. Witt, K. Neumann, A. Bergk, J. Halangk, V. Weich, T. Müller, G. Puhl, B. Wiedenmann, and T. Berg.** 2008. Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- α -based therapy. *Journal of Viral Hepatology* **15**:71-78.

75. Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Näslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljeström, and C. Reis e Sousa. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**:887-892.
76. Schulze zur Wiesch, J., G. M. Lauer, C. L. Day, A. Y. Kim, K. Ouchi, J. E. Duncan, A. G. Wurcel, J. Timm, A. M. Jones, B. Mothe, T. M. Allen, B. McGovern, L. Lewis-Ximenez, J. Sidney, A. Sette, R. T. Chung, and B. D. Walker. 2005. Broad repertoire of the CD4⁺ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *Journal of Immunology* **175**:3603-3613.
77. Shiina, M., and B. Rehermann. 2008. Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function. *Hepatology* **47**:385-395.
78. Shin, H., and E. J. Wherry. 2007. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current Opinions in Immunology* **19**:408-415.
79. Shoukry, N. H., A. G. Cawthon, and C. M. Walker. 2004. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annual Review of Microbiology* **58**:391-424.
80. Shoukry, N. H., A. Grakoui, M. Houghton, D. Y. Chien, J. Ghrayeb, K. A. Reimann, and C. M. Walker. 2003. Memory CD8⁺ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine* **197**:1645-55.
81. Smyk-Pearson, S., I. A. Tester, J. Klarquist, B. E. Palmer, J. M. Pawlotsky, L. Golden-Mason, and H. R. Rosen. 2008. Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. *Journal of Virology* **82**:1827-1837.
82. Spangenberg, H. C., S. Viazov, N. Kersting, C. Neumann-Haefelin, D. McKinney, M. Roggendorf, F. von Weizsäcker, H. E. Blum, and R. Thimme. 2005. Intrahepatic CD8⁺ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **42**:828-837.
83. Spörri, R., and C. Reis E Sousa. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4(+) T cell populations lacking helper function. *Nature Immunology* **6**:163-170.
84. Steinman, R. M., and J. Banchereau. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**:419-426.
85. Sumpter, R., Y. M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon, and M. Gale. 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *Journal of Virology* **79**(5):2689-99:2689-2699.
86. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* **12**:1198-1202.
87. Urbani, S., B. Amadei, D. Tola, M. Massari, S. Schivazappa, G. Missale, and C. Ferrari. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *Journal of Virology* **80**:11398-11403.

88. Urbani, S., B. Amadei, D. Tola, G. Pedrazzi, L. Sacchelli, M. C. Cavallo, A. Orlandini, G. Missale, and C. Ferrari. 2008. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: Effect of viremia levels and antiviral treatment. *Journal of Hepatology* doi:10.1016/j.jhep.2007.12.014.
89. Wherry, E. J., D. L. Barber, S. M. Kaech, J. N. Blattman, and R. Ahmed. 2004. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:16004-16009.
90. Wilson, N. S., G. M. Behrens, R. J. Lundie, C. M. Smith, J. Waithman, L. Young, S. P. Forehan, A. Mount, R. J. Steptoe, K. D. Shortman, T. F. de Koning-Ward, G. T. Belz, F. R. Carbone, B. S. Crabb, W. R. Heath, and J. A. Villadangos. 2006. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nature Immunology* **7**:165-172.
91. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**:640-3.
92. Young, L. J., N. S. Wilson, P. Schnorrer, A. Mount, R. J. Lundie, N. L. La Gruta, B. S. Crabb, G. T. Belz, W. R. Heath, and J. A. Villadangos. 2007. Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**:17753-17758.
93. Zhang, J. Y., Z. Zhang, X. Wang, J. L. Fu, J. Yao, Y. Jiao, L. Chen, H. Zhang, J. Wei, L. Jin, M. Shi, G. F. Gao, H. Wu, and F. S. Wang. 2007. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* **109**:4671-8.
94. Zhang, S. Y., E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chaggier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cognet, H. von Bernuth, C. L. Ku, A. Casrouge, X. X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Héron, L. Vallée, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova. 2007. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **317**:1522-1527.

Figure 14. *TLR activation of MDCs varies among viremic patients and contrasts with that of aviremic and normal donors.* TNF- α (A) and IL-12 (B) \log_2 fold-expression above baseline ($\text{MFI}^{\text{stimulated}}/\text{MFI}^{\text{unstimulated}}$) by lineage $^{-}$ CD8 α^{-} CD16 $^{-}$ CD45 $^{+}$ CD11c $^{+}$ MHC-II $^{\text{br}}$ MDCs responding to TLR agonists (denoted by a colored dot at the bottom on the x axis: black, TRIF-dependent; blue, MyD88-dependent pathways) from 19 HCV-infected viremic patients (open triangles), 12 aviremics (closed circles) and 6 healthy donors (open circles). Short horizontal lines represent the average for each HCV-seropositive group; gray circles for healthy donors. Differences between healthy donors, viremics and aviremics, as calculated by one-way ANOVA with Tukey's post-test, are shown above the graph where significant (denoted by * <0.05 ; ** <0.01). Each symbol corresponds to one subject at one time point.

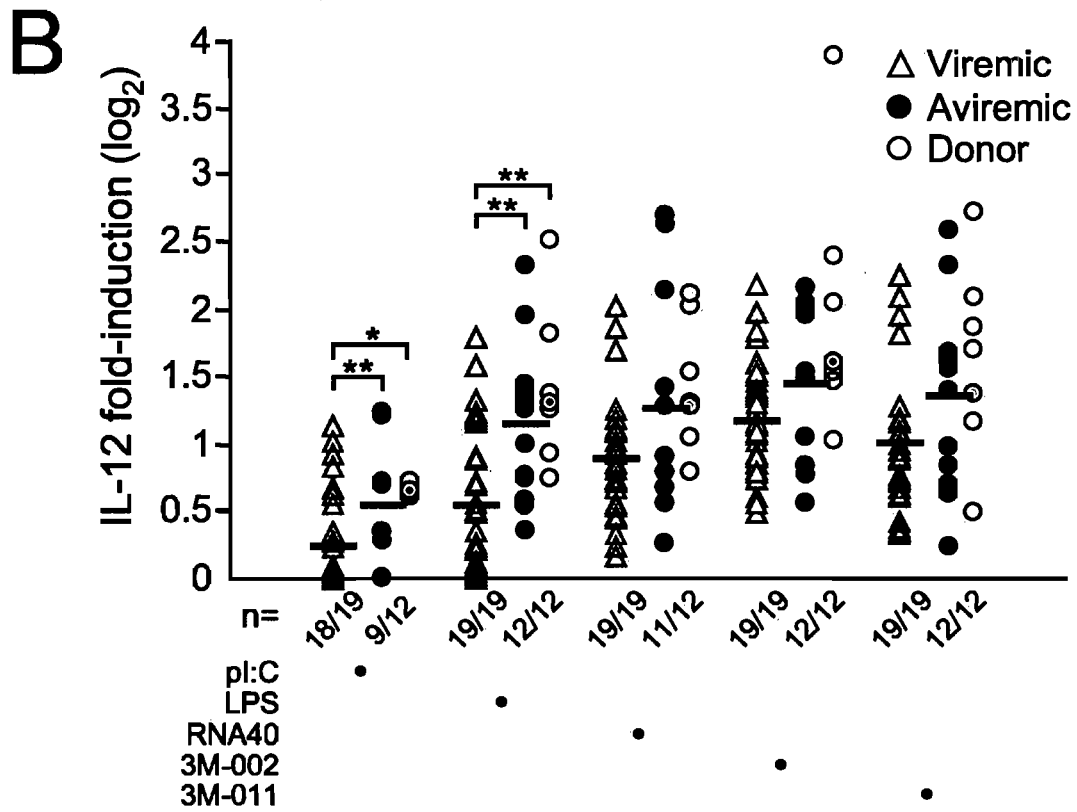
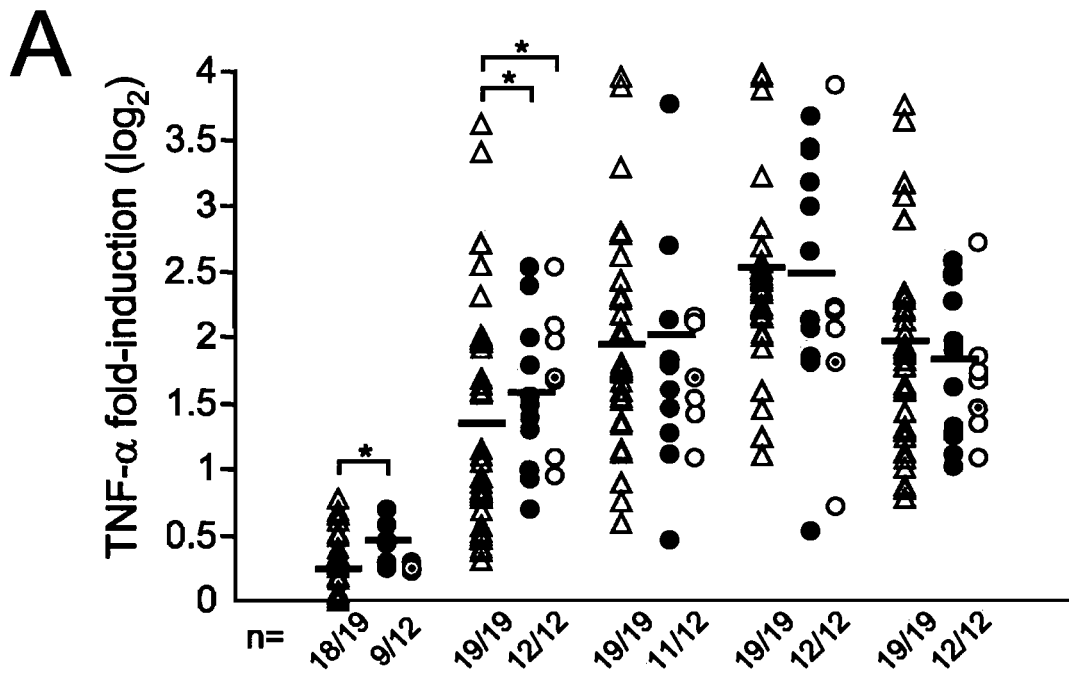


Figure 15. *Intact TLR7/8-activities in MDCs of CP-D viremic patients despite an established lack of response to agonists of TLR3 and TLR4 danger sensing pathways.* PBMCs were cultured in the presence of brefeldin A and TLR agonists for 6 hours. Cells were recovered and stained for the indicated intracellular proteins. (A) Heat maps indicating \log_2 'fold change' in IL-12 and TNF- α protein expression (MFI) profiles for lineage⁻CD16⁻CD45⁺CD11c⁺MHC-II^{br} MDCs responding to TLR agonists at week 0 (rows). Expression signatures from six normal blood donors (D01-D06), eight aviremic (R01-08) and 11 viremic (HCV) patient samples were grouped according to similarity using the complete linkage hierarchical clustering algorithm in MeV software (left margin). Each colored dot at the top of the map denotes either IL-12 (gray) or TNF- α (black) positivity. FACS measured protein expression fold-change relative to aviremic donors is indicated by the color intensity scale (red, higher than; blue, lower than; white, no change relative to aviremics). (B) Bar graphs (averages \pm SD) show groupwise comparisons between CP-N and CP-D subjects. TNF- α increases above baseline (x -fold; $\log_2[\text{MFI}^{\text{stimulated}}/\text{MFI}^{\text{unstimulated}}]$) are shown for each cluster. Statistical comparisons between groups were calculated by the Mann-Whitney rank sum test (**, $P < 0.0001$ versus CP-N). (C) Histogram data of IL-6⁺ gated MDCs positive for TNF- α underlying the heat maps in panel A and longitudinal data in panel D are shown following LPS or 3M-002 stimulation in two representative patient samples (of X), namely, HCV-P50 (CP-D) and HCV-P55 (CP-D). Numbers on left hand side of and above bracketed lines indicate the MFI and percentages of TNF- α -expressing cells in the designated area. (D) IL-12 and TNF- α was measured at various time-points (0, 12, 24 weeks) by flow cytometry analysis of stimulated MDCs from viremic patients. Cytokine expression levels are represented as the mean values (\pm SEM) \log_2 'fold change' ratios as calculated in panel A for each CP cluster at each time point sampled.

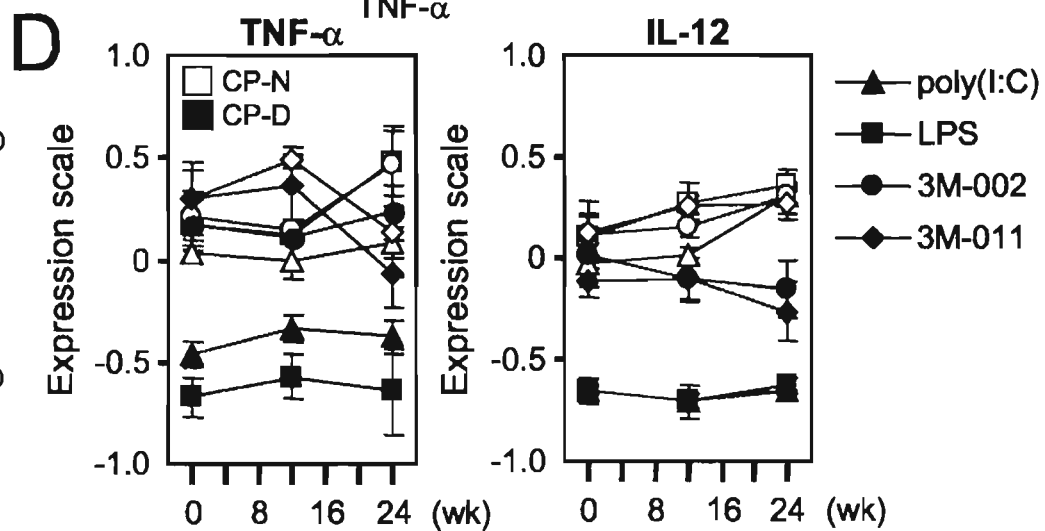
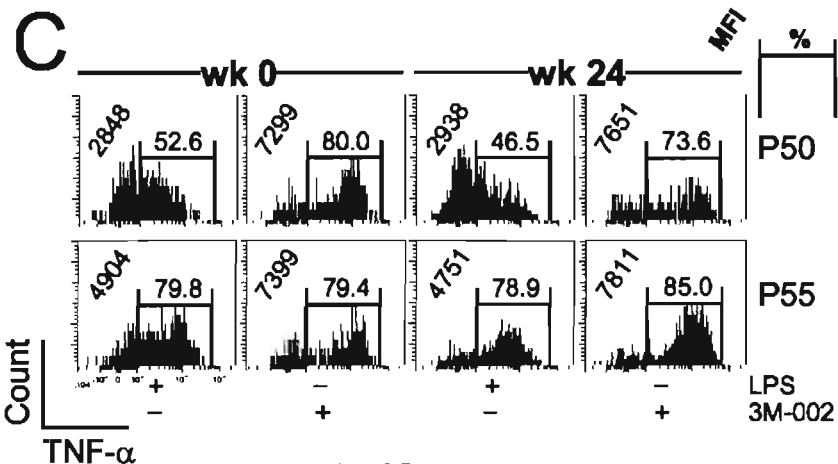
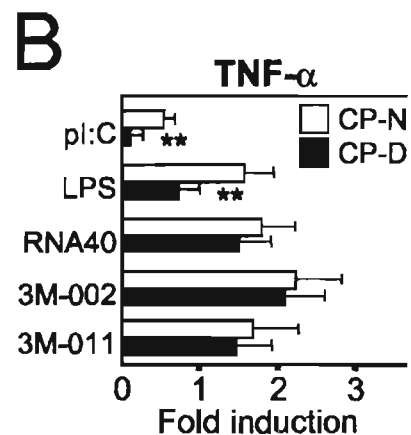
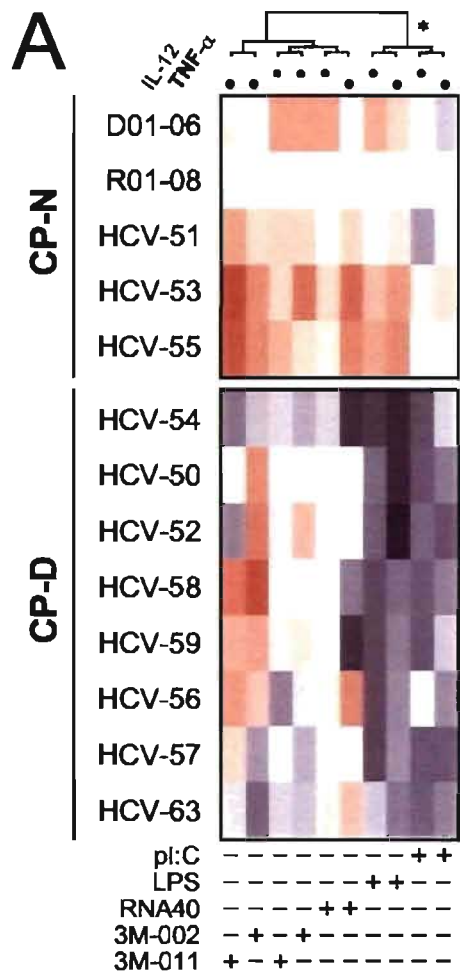


Figure 16. *Reversal of HCV-induced TRIF-dependent-inactivation in MDCs of CP-D patients by HCV antiviral inhibitors.* PBMCs were cultured in duplicates for 24 h in the absence or presence of cell-permeable small-molecule HCV inhibitors before the addition of brefeldin A and TLR agonists for a further 6 h. Cells were recovered and stained for the indicated intracellular proteins. (A) Representative intracellular cytokine staining data from a CP-D subject following a 24 hour incubation with either vehicle alone (0.1% DMSO, V), NS3 protease inhibitor BILN2061 (PI) or NS5B polymerase inhibitor VIR235 (PolI) (left panel). 10% contour plots are gated on IL-6-expressing MDCs (refer to Material and Methods). Numbers in bottom right corners indicate the percentages of cells in the designated areas. (Right panel) HCV RNA abundance in PBMCs (cVLs; black bars) for each condition. The solid gray vertical line above 10^4 on the x axis represents the 0% inhibition reference point. (B) Summary data for the percentage of IL-12⁺TNF- α ⁺ out of IL-6⁺ MDCs in the presence or absence of HCV antiviral inhibitors (n= 10; statistical comparisons were made using the Wilcoxon matched pairs test). Data are the averaged values for replicates for one subject from one experiment each and short horizontal bars indicate mean. (C) The pie charts depict the mean proportion of all individual MDC functional response patterns (white, IL-12⁻TNF- α ⁻; gray, IL-12⁻TNF- α ⁺; black, IL-12⁺TNF- α ⁺) for all CP-D patients analyzed by FACS and the value on the right of each pie represents the percentage of the total response (IL-6-expression) to the respective stimuli. (D) Statistical analysis of the data in C (proportion of the total MDC response contributed by IL-12 and TNF- α expressing MDCs) for the correlation between LPS responsiveness and effect of HCV inhibition on cytokine production; analysed using the Spearman correlation.

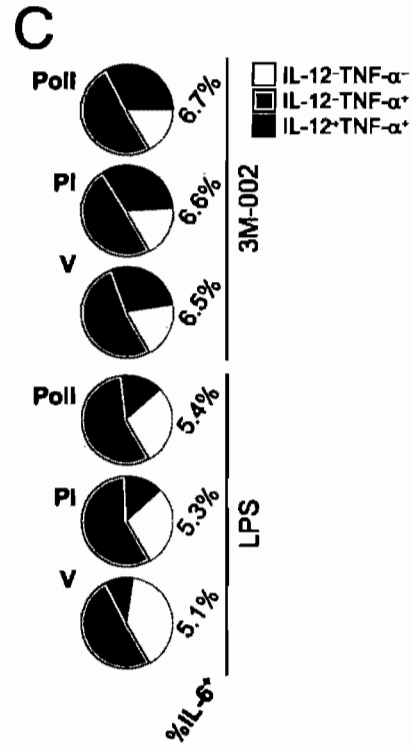
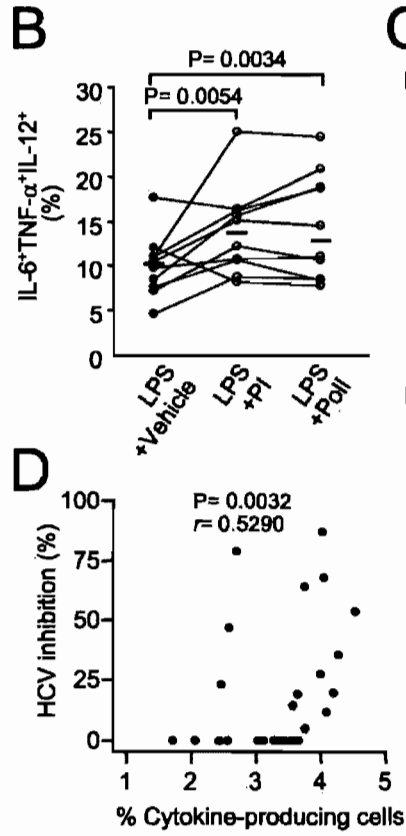
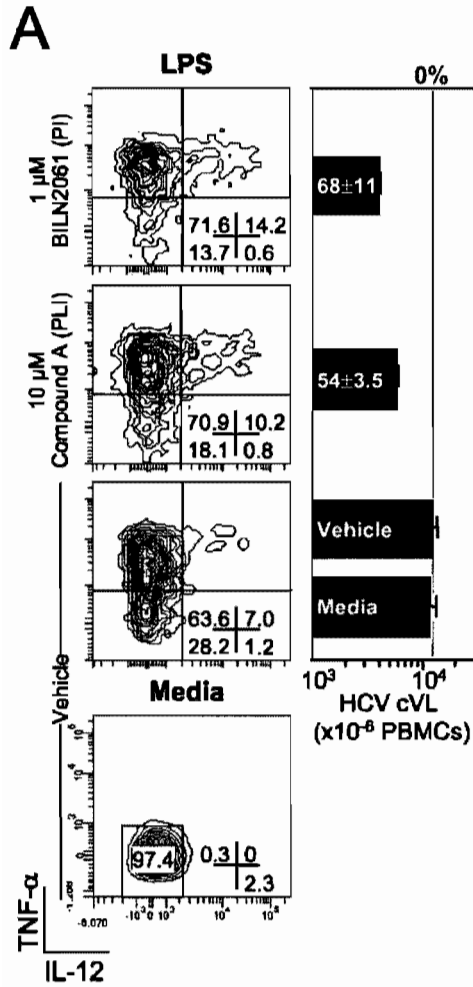


Figure 17. *Detectable HCV-specific CD8⁺ T cell responses in CP patient groups.* Percentages of CD3⁺8⁺4⁻ memory/effector T cells that are cytokine⁺ and degranulate in response to either NS3 (filled bars) or NS5B (open bars). Background activity against CD28/CD49d costimulation alone has been subtracted. For each seropositive donor, all positive peripheral blood responses to either NS3 or NS5B pools (based on individual functional patterns displayed as in Fig. 18C) were summed to determine the total NS-specific response within the memory CD8⁺ peripheral blood T cell populations. See panel A of figure 18 for a representative example of the flow cytometry data used to calculate the responding CD8⁺ memory/effector frequencies.

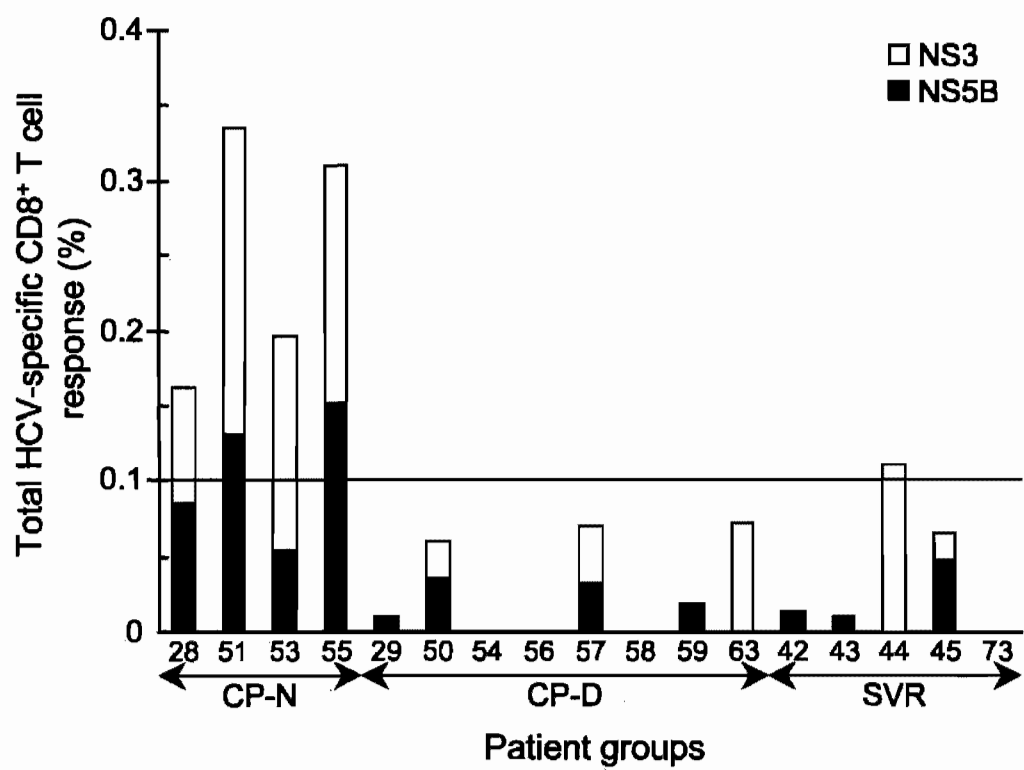


Figure 18. *Polyfunctional HCV-specific CD8⁺ T cells are prominent in CP-N patient group.* (A) PBMCs from subject P63 (CP-D) were stimulated with costimulation plus mixtures of consecutive, overlapping 18-mer peptide pools comprising complete HCV NS3 or NS5B proteins or with CEF or costimulation alone (CD28/CD49d, negative control) and then were examined by cytometry for their correlated expression of surface CD3 and CD8⁺ and intracellular CD107a, IFN- γ , IL-2 and TNF- α . The FACS profiles (3% density plots) shown were gated on CD3⁺8⁺4⁻ small lymphocytes, with the responding T cells designated by the boxed areas (background adjusted % in upper right corner of each profile). The results shown are typical of infected donors in which certain pools generated clusters of responding cells over and above the spontaneous activation noted in controls. The pie charts at the bottom depict all individual T cell functional response patterns (concentric colored arcs surrounding the chart: blue, CD107a; black IFN- γ ; orange, IL-2; red, TNF- α) and each portion of the pie indicates the percentage of virus-specific CD8⁺ T cells that responded with one, two, three, or four functions (see colored legend panel D); the value in the center of each pie represents the total response to the respective stimuli. (B) Memory phenotype of the of the virus-specific CD8⁺ T cells (from panel A), shown color-coded by the number of positive functions expressed (see panel C), are overlaid onto the total CD8⁺ T cell population. (C-D) The functional composition of CD8⁺ T cell responses is shown with boxes representing medians and interquartile ranges of the proportion of the respective functional response toward the total memory CD8⁺ T cell response against NS3 and NS5B. Every possible combination of response (denoted by a dot) is shown on the x axis. Responses are grouped and color coded according to the number of functions. The data are summarized by pie charts in panel D, in which each slice of the pie represents the fraction of the total response that consists of CD8⁺ T cells positive for a given number of functions. In panel C, all viremics were combined into one group for CEF analysis, which was then deconvoluted into pie formats for each cluster in panel D. The results shown were generated from the determinations in 4 CP-N and 5 CP-D responders. Asterisks (Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test) are placed above response pairs that are significantly different: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 . (E) The proportion of the total HCV-specific memory CD8⁺ T cell response contributed by each of the four functions in 4 CP-N (blue triangles), 5 CP-D (open triangles) and 5 aviremic (squares) subjects; each symbol represents one patient's response to NS3 or NS5B. Differences were assessed by one-way Anova and the Tukey post-test was used for paired comparisons between groups and time-points, which are presented where significant (denoted by * <0.05 ; *** <0.001).

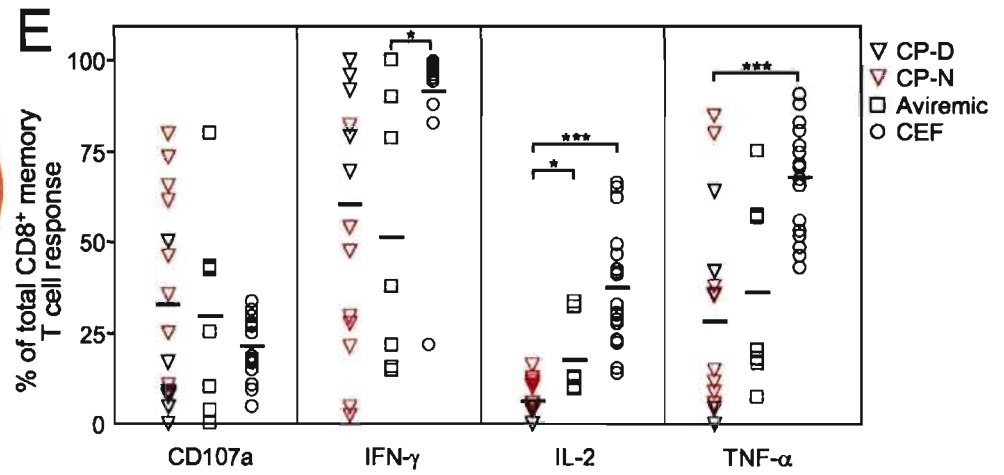
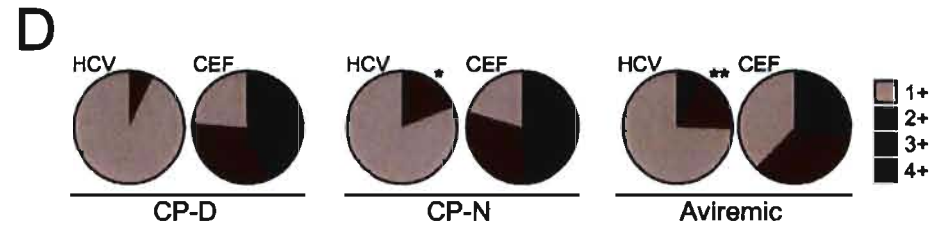
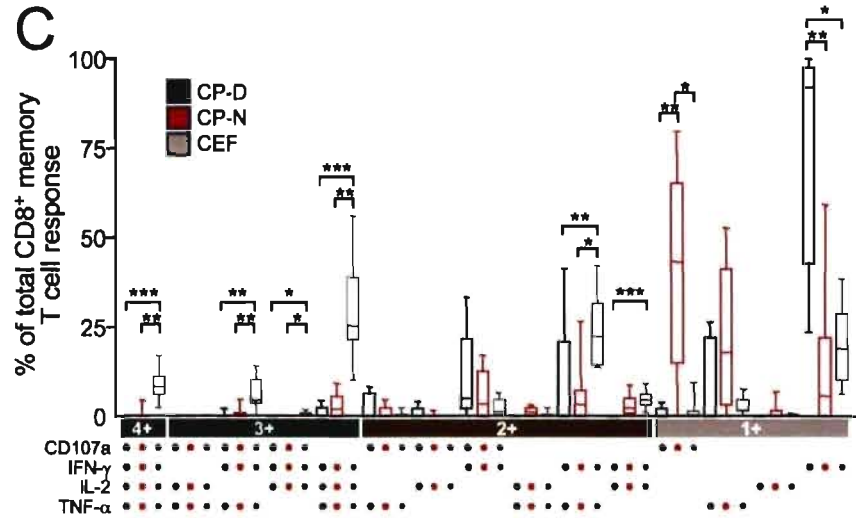
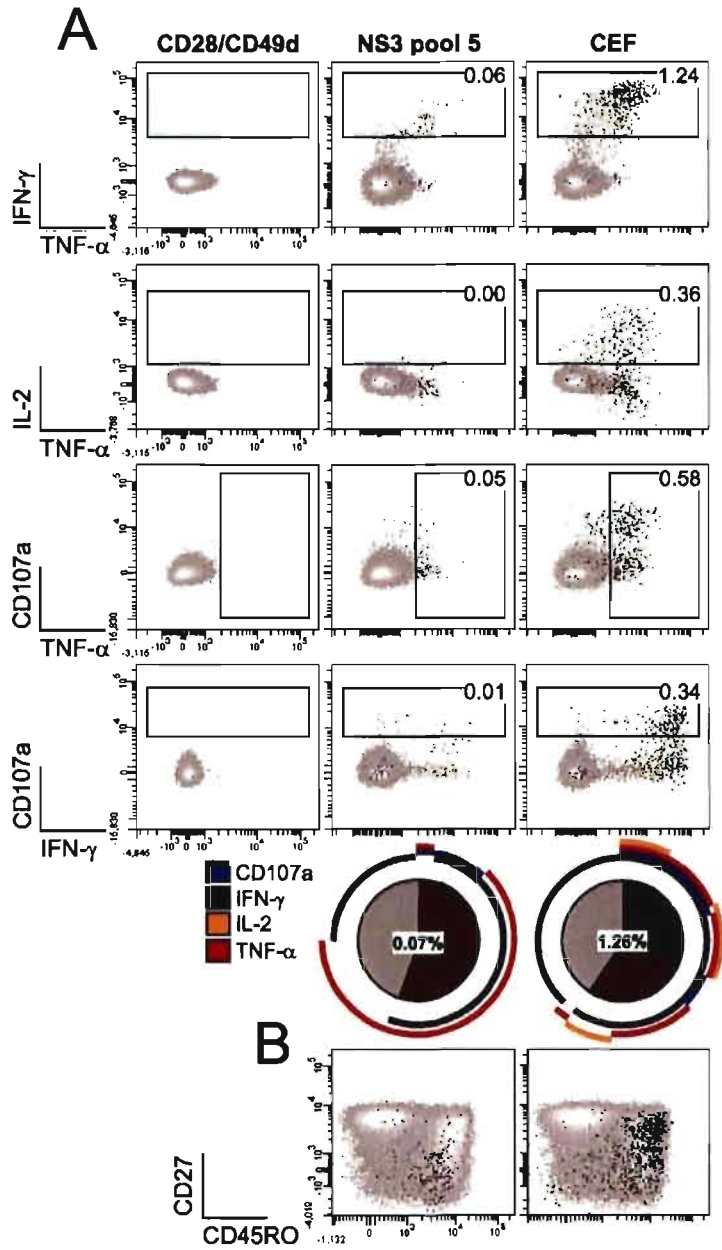
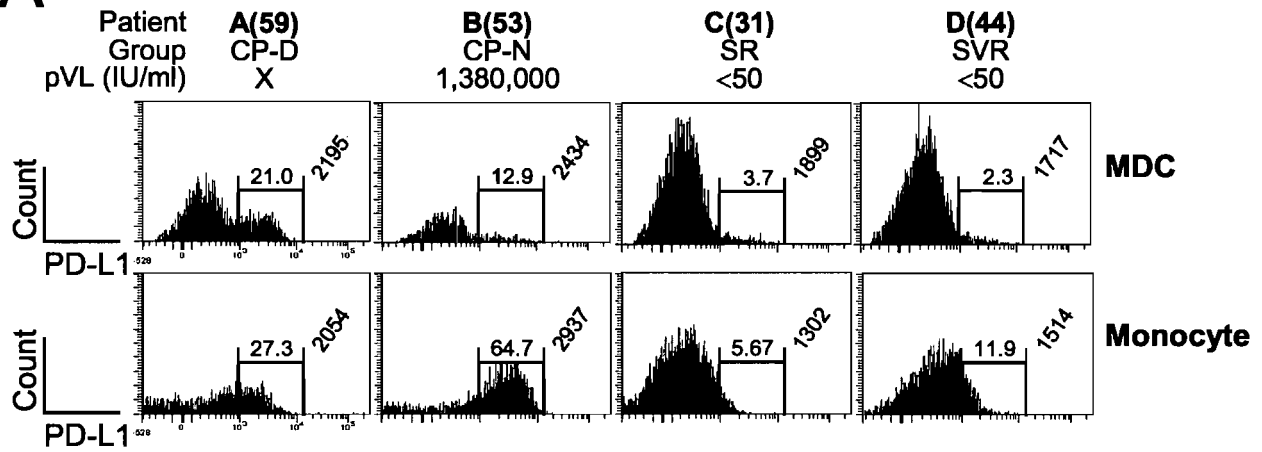


Figure 19. *PD-L1 is upregulated at the surface of MDCs and monocytes in chronic HCV-infected subjects.* (A) Cells from four HCV-seropositive subjects; subjects A-B had chronic viremia (A, CP-D; B, CP-N); C, untreated aviremic able to spontaneously control infection; subject D had controlled infection (viral load <50 RNA copies per ml) by antiviral therapy. Histograms are gated on unstimulated MDCs (top panel) or lineage⁻CD16⁻CD45⁺CD11c⁺CD14⁺MHC-II⁺ monocytes (bottom panel). Numbers on right hand side of and above bracketed lines indicate the geometric MFI (geoMFI) and percentages of PD-L1 expressing cells in the designated area; geoMFI values correspond to PD-L1 expression in the PD-L1⁺ populations. (B) PD-L1 surface expression was measured at various time-points (0, 12, 24, 52 weeks) by flow cytometry analysis of unstimulated PBMC from viremic patients (triangles), aviremics (squares), and HCV-seronegative controls (n=10, circles). Short horizontal bars indicate mean log₁₀ geoMFI. The horizontal line indicates a geoMFI expression of PD-L1 on these MDCs that is twice the SD of the mean of the geoMFI of MDCs expressing PD-L1 in uninfected controls. Analysis of variance was used for comparison among all groups of subjects; the Tukey post-test was used for paired comparisons between groups and time-points, which are presented where significant (denoted by *<0.05; **<0.01; ***<0.001). #, Mann-Whitney U test between week 0 and aviremics (P= 0.002). Data are representative of one experiment each with the total number of subjects shown on graph. Each symbol corresponds to one subject at one time point.

A



B

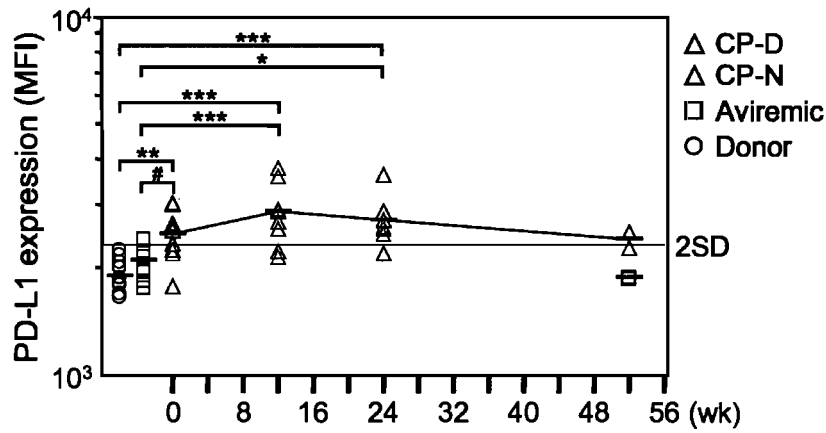


Figure 20. *Markers of defective MDCs are associated with failure to produce IL-2, but not with IFN- γ production, in HCV-specific CD8⁺ T cells.* (A-C) Relationship of the frequency of IFN- γ ⁺ HCV-specific CD8⁺ T cells (A,C) and number of HIV-specific CD8⁺ T cells (as measured by cytokines and CD107a mobilization; B) with PD-L1 expression by MDCs (A,B) and with the cell-associated viral load (cVL; C) in the subjects studied in Figure 18. (D) Relationship between the ratio of IL-2-producing to INF- γ -producing HCV-specific CD8⁺ T cells with the cVL (D) and LPS-induced log₂ fold-change (summation of TNF- α and IL-12) in cytokine expression by MDCs (E). Correlation statistics for A–E were analysed using the Spearman correlation. Each symbol corresponds to one subject responding to one specificity (either NS3 or NS5B). Data are representative of one experiment each with a total of 14 (A,C-E) or 18 subjects (B). HCV-seropositive subjects (17) with CEF-specific CD8⁺ T cell responses are shown in the right panels.

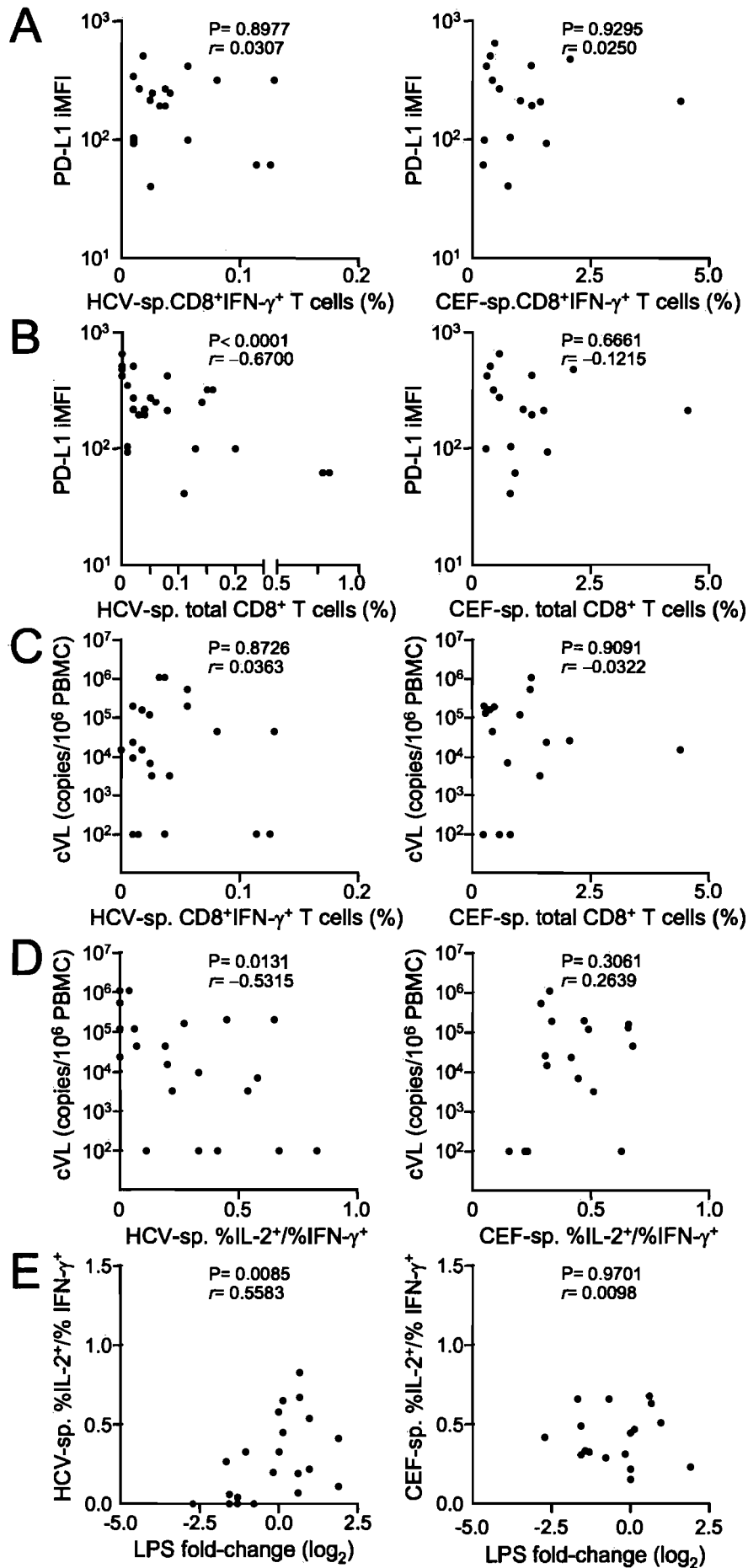


Table 6. Virological and immunological characteristics of the HCV-infected patients.

	Aviremic	CP-N ^c	CP-D ^d	P= ^e	versus group
Patient	N= 16	8/22 (36%)	14/22 (64%)		
Demographics	Age (yr±SD)/Sex	50 ± 8 (8 F: 8 M)	48 ± 4 (3 F: 5 M)		
Outcome	SR (6), SVR (10)	CH (5), NR (3)	CH (9), NR (5)		
Genotype, no. of subjects	1	4	2		
	1a	4	6		
	1b	3	1		
	2b		1		
	unknown	5			
ALT ^f	U/ml	NA	103 ± 55	61 ± 43	
AST ^f	U/ml	NA	68 ± 49	52 ± 28	
Viremia ^g	log ₁₀ IU/ml	<1.7	6.5 ± 0.1	6.4 ± 0.2	
cVL ^b	Copies	2.6 ± 0.2*** (<2.0-3.5)	4.6 ± 0.2 (4.1-5.2)	5.2 ± 0.1 (4.8-5.6)*	<0.05* CP-N <0.001*** CP-N & -D
	Positivity rate	4/16 (25%)	8/8 (100%)	14/14 (100%)	
% Inhibition ^g	+BILN2061 (PI)	N/A	0	55.6 ± 7.7*	0.0351* Poll
	+MIR235 (Poll)	N/A	0	32.4 ± 6.9	
PD-L1/CD274	% of MDCs	5.4 ± 1.1	9.3 ± 1.2*	10.9 ± 1.1**	0.0205* Aviremic 0.0176**
	MFI	2039 ± 224	2737 ± 199**	2588 ± 88**	<0.01** Aviremic

Abbreviations: N/A, not available; CH, chronic never treated; NR, nonresponse; SR, spontaneous resolution; SVR, sustained viral response.

^fEnzyme levels are expressed as mean ± SD.

^gPlasma viral load measured with Cobas AmpliPrep/TaqMan HCV Test at the time of collection of blood samples; log₁₀ ± SE IU/ml (at the start of study entry, week 0)

^bMeasured with a nested real-time qRT-PCR using hybridization probes on a RotorGene instrument; mean ± SE (25th-75th percentile) HCV RNA log₁₀ copies x10⁻⁶ PBMCs.

^cThe fraction of inhibition was calculated from the levels of HCV RNA in PBMCs at 24 hours post-treatment (mean % ± SE).

^dClinical sub-groups of viremic patients identified as based on MDC functionality clustering (see Fig. 15).

^eStatistical analysis used the following: one-way Anova (P <0.0001) with Tukey post-test, comparing cVL values; Wilcoxon signed rank test, comparing % HCV inhibition with small molecule inhibitors; Mann-Whitney rank sum test, comparing PD-L1⁺ MDC blood frequency; one-way Anova (P=0.0008) with Tukey post-test, comparing PD-L1 fluorescence intensity (geometric MFI) on MDCs.

Table 7. Patients with functionally characterized NS3- or NS5B-specific CD8⁺ T cell responses.

Patient (n=18)	Age (yr)/Sex	Genotype	Viremia ^a (IU/ml)	Therapy	Outcome	Group ^b	cVL ^c	CD3 ⁺ 8 ⁺ 4 ⁺ T cell responses ^d					4 ⁺ ^e
								NS3		NS5B		CEF	
								%	Pool #	%	Pool #	%	
P28	46/M	1b	4,940,000	Riba+pIFN α ^f	NR	CP-N	4.10	0.08	5 & 6	0.084	10 & 11	4.55	
P51	43/F	1a	3,410,000	Riba+pIFN α ^f	NR	CP-N	5.31	0.21	5 & 6	0.13	10 & 11	0.29	
P53	48/F	1a	1,380,000	Riba+pIFN α ^f	NR	CP-N	4.05	0.14	5 & 6	0.06	10	1.5	
P55 [†]	54/M	1a	1,174,898	Riba+pIFN α	SVR	CP-N	3.71	0.16	5 & 6	0.15	10 & 11	0.44	+
P29	59/F	1b	2,880,000	Riba+pIFN α ^f	NR	CP-D	5.22	0		0.01	10	1.59	
P50	49/M	1b	9,300,000	Riba+pIFN α ^f	NR	CP-D	4.85	0.03	5 & 6	0.04	10 & 11	1.08	
P54	50/M	1b	642,000	Riba+pIFN α ^f	NR	CP-D	6.16	0		0		0.57	
P56	54/M	1	11,600,000	Naive	CH	CP-D	5.61	0		0		0.31	
P57	44/F	1a	5,800,000	Naive	CH	CP-D	5.92	0.04	5	0.03	10	1.25	
P58	53/F	1a	693,000	Naive	CH	CP-D	4.78	0		0		2.13	
P59	60/F	1a	387,000	Naive	CH	CP-D	4.94	0		0.02	10	0.38	
P63	72/M	1b	4,210,000	Naive	CH	CP-D	5.73	0.07	5	0		1.26	
P31	49/M	1	≤50	Naive	SR	Aviremic	<2.00	0.81	5 & 6	0.79	10 & 11	0.89	+
P42 [‡]	53/M	1a	≤50	Riba+pIFN α ^f	SVR	Aviremic	3.97	0		0.01	10	NA	
P43	45/M	1b	≤50	Riba+pIFN α ^f	SVR	Aviremic	<2.00	0		0.01	11	0.82	
P44 [‡]	49/F	1a	≤50	Riba+pIFN α ^f	SVR	Aviremic	3.85	0.11	5	0		0.79	+
P45	47/F	1a	≤50	Riba+pIFN α ^f	SVR	Aviremic	<2.00	0.01	6	0.05	10 & 11	0.57	
P73	55/M	1b	≤50	Riba+pIFN α ^f	SVR	Aviremic	N/A	0		0		0.76	

Abbreviations: N/A, not available; Riba+pIFN α , ribavirin and pegylated interferon- α 2 combined therapy; CH, chronic never treated; NR, nonresponse; SR, spontaneous resolution; SVR, sustained viral response.

^aMeasured with Cobas AmpliPrep/TaqMan HCV Test at the time of collection of blood samples; IU/ml (at the start of study entry, week 0)

^bMeasured with a nested real-time qRT-PCR using hybridization probes on a RotorGene instrument; HCV RNA log₁₀ copies x10⁶ PBMCs at moment T cell testing occurred.

^cClinical sub-groups of patients identified as based on MDC functionality (see figure 15)

^dFrequencies are cytokine-producing (IFN- γ , IL-2, TNF- α), degranulating (CD107a) cells out of CD8⁺ memory subset. Each HCV pool consisted of 45-50 18-mers peptides overlapping by 11 amino acids. Pools 5,6,10 and 11 spanned the complete NS3 and NS5B sequence. All positive peripheral blood responses to either NS3 or NS5B pools were summed to determine the total NS antigen-specific response within the memory CD8⁺ peripheral blood T cell populations. Frequencies \geq 0.10% are shown in bold.

^ePresence (denoted by a + sign) of a population of HCV-specific CD8⁺ T cells (\geq 1% of total response) classified as having simultaneously the four measured functions (4+).

[†]Refer to Materials and Methods for description of this particular patients treatment history. Clustering and T cell testing occurred prior to treatment onset.

[‡]Antiviral therapy discontinued >6 months.

[§]Avireemics with detectable cVLs; *P31 was cVL positive at week 0 (3.33 log₁₀ RNA copies/10⁶ PBMC), and negative at 52 weeks (moment T cell testing occurred)

Table 8. Patients included in study.

Patient (n=38)	Age/Sex	Genotype	Viremia ^a (IU.ml ⁻¹)	Therapy	Outcome	Group ^b	cVL ^c
P28	46/M	1b	6.69	OFF	NR	CP-N	+
P47	50/M	2b	N/A	ON	CH→SVR	CP-N	+
P51	43/F	1a	6.53	OFF	NR	CP-N	+
P53	48/F	1a	6.14	OFF	NR	CP-N	+
P55	54/M	1a	6.07	ON	CH→SVR	CP-N	+
P64	52/M	1a	6.87	ON	CH→NR	CP-N	NA
P69	45/M	1a	N/A	ON	CH→SVR	CP-N	NA
P70	49/F	1a	6.64	ON	CH→SVR	CP-N	NA
P29	59/F	1b	6.45	OFF	NR	CP-D	+
P30	49/M	1	5.90	OFF	NR	CP-D	+
P48	43/M	1a	7.19	ON	CH→NR	CP-D	+
P50	49/M	1b	6.96	OFF	NR	CP-D	+
P52	43/M	1a	5.70	OFF	NR	CP-D	+
P54	50/M	1b	5.81	OFF	NR	CP-D	+
P56	54/M	1	7.06	None	CH	CP-D	+
P57	44/F	1a	6.76	None	CH	CP-D	+
P58	53/F	1a	5.84	None	CH	CP-D	+
P59	60/F	1a	5.59	None	CH	CP-D	+
P60	49/M	1a	6.89	ON	CH→SVR	CP-D	NA
P63	72/M	1b	6.62	None	CH	CP-D	+
P65	44/F	1b	6.16	ON	CH→NR	CP-D	+
P71	45/F	1a	6.92	ON	CH→NR	CP-D	NA
P31	49/M	1	<1.7	None	SR	Aviremic	+
P35	49/M	1	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	-
P36	44/F	NA	<1.7	None	SR	Aviremic	-
P38	60/F	NA	<1.7	None	SR	Aviremic	+
P39	55/F	NA	<1.7	None	SR	Aviremic	-
P40	50/M	NA	<1.7	None	SR	Aviremic	-
P41	43/F	NA	<1.7	None	SR	Aviremic	-
P42	53/M	1a	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	+
P43	45/M	1b	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	-
P44	49/F	1a	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	+
P45	47/F	1a	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	-
P46	40/F	1a	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	NA
P66	55/M	1	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	NA
P67	70/F	1b	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	NA
P68	35/M	1	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	NA
P73	55/M	1b	<1.7	OFF	SVR	Aviremic	NA

Abbreviations: N/A, not available; CH, chronic never treated; NR, nonresponse; SVR, sustained viral response after infection clearance.

^aMeasured with Cobas AmpliPrep/TaqMan HCV Test at the time of collection of blood samples; IU/ml (at the start of study entry, week 0).

^bClinical sub-groups of HCV viremic patients identified as based on MDC functionality (see Materials and Methods). Patients with a red bold CP grouping initiated ribavirin/pegylated IFN- α_2 combined therapy; clustering analysis occurred before treatment onset.

^cMeasured with a nested real-time qRT-PCR using hybridization probes on a RotorGene instrument; HCV RNA log₁₀ copies x10⁻⁶ PBMCs (at the start of study entry, week 0).

CHAPITRE IV
DISCUSSION ET CONCLUSION

La persistance de l'infection après une hépatite C aiguë chez l'individu résulte de l'incapacité de réponses immunes, *a priori* adaptées, à éliminer l'infection virale. Cette incapacité ne dépend pas seulement de la vigueur et de la diversité de ces réponses, mais aussi des caractéristiques propres du VHC qui influencent l'interaction entre l'immunité innée et adaptative. De nombreux pathogènes chroniques ont "*appris*" comment détourner les systèmes de défense des organismes en infectant efficacement les DC: les virus VIH et HSV en sont des exemples. Un article récent écrit par des spécialistes de la question titrait encore: "*Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence?*" (444). Le concept date pourtant de plusieurs années et a été popularisé à partir d'observations montrant que la capacité allostimulatrice des DC dérivées à partir de monocytes CD14⁺ (Mo-DC) originant de sujets virémiques non-traités était inhibée, contrairement à celle de donneurs avirémiques traités aux IFN- α_2 ou sains (29, 279). La raison de ce questionnement persistant est sans doute à rechercher dans une surinterprétation des résultats obtenus dans des conditions expérimentales peu physiologiques (c-à-d. Mo-DC), et dans une généralisation abusive du modèle qui en a été tiré. De là l'établissement d'un paradigme résumant le sort et la fonction des DC dans le cadre de l'infection au VHC en deux hypothèses contradictoires (dysfonction versus normalité). De là aussi l'idée, vite dominante, que les DC ne sont pas infectées, que leurs fonctions de présentation d'antigène ne sont pas compromises et que les défauts observés sont une conséquence passive de pathologies secondaires émanant d'une virémie plasmatique élevée (142). On verra dans ce chapitre que ce raisonnement s'appliquait mieux au modèle qu'aux données expérimentales réelles. En l'absence de données sur les DC primaires, cette vision schématique était en effet construite sur des observations effectuées dans des conditions expérimentales particulières (systèmes de dérivation *in vitro* de DC) qui sont pratiques d'un point de vue technique, mais dont les caractéristiques fonctionnelles ne reflètent pas la réalité physiologique, et qui, trop vite, ont été constituées en norme. En fait, une semaine de culture avec des doses élevées de GM-CSF et d'IL-4 n'a probablement qu'amélioré les capacités présentatrices d'antigènes de précurseurs non-défectifs dans le système *in vitro* (496) et permis de surmonter le défaut immunologique présent *in vivo* dans

une sous-population de DC. Ainsi, sans remettre en cause l'utilité du système Mo-DC, l'ensemble de ces éléments et des études réalisées pour cette thèse, combinant cytométrie et analyse directe de MDC primaires, justifie un réexamen de la pertinence physiologique des DC dans l'infection VHC.

L'objectif de cette discussion est donc de présenter un autre point de vue sur ces cellules et leurs fonctionnements (voir la section 4, chapitre I). Avant d'entamer cette analyse critique, il convient de préciser ici l'objet dont on parle, car il n'y a pas une, mais de nombreuses façons d'activer les MDC, par exemple les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α etc.), le LPS, le Pam₃CysK₄, le ssRNA40. Les partenaires moléculaires (c-à-d. récepteurs PRR) étant différents dans chaque cas, chacun de ces objets doit donc être analysé spécifiquement, et il est important de se garder de généralisations anticipées, un point de vue qui est trop souvent mal apprécié par les auteurs d'étude concernant les DC et l'infection VHC. Bien que des MDC de patients virémiques activées par TNF- α soient fonctionnellement compétentes (c.-à-d. qu'elles peuvent stimuler l'expansion clonale de mémoires CD4⁺ influenza-spécifique) (366), ce résultat *a priori* encourageant voulant que la signalisation du récepteur TNF ne soit pas affectée par l'infection chronique au VHC ne renseigne toutefois pas sur le potentiel d'activation des DC en réponse aux PAMP connus pour retransmettre des signaux d'alarme par les PRR consacrés à la détection de constituants viraux (ex. dsRNA par le TLR3), lesquels sont paradoxalement restés inexplorés. Malgré une exécution prudente des expériences, la conclusion tirée de ces observations par les auteurs se résume à une capacité fonctionnelle normale des MDC circulantes dans des patients atteints d'une hépatite C chronique. Dans ce qui suit, nous porterons un intérêt particulier à la structure et au fonctionnement des TLR antiviraux exprimés par les MDC, en particulier les TLR3, 4 et 8. Rappelons que si d'autres cellules comme les cellules B, les PDC ou les monocytes/macrophages expriment des TLR et peuvent également présenter des antigènes à des cellules T activées, les MDC sont les seules CPA capables, *in vivo*, d'activer pleinement l'induction de CD8⁺ cytotoxiques. D'ailleurs, la déplétion *in vivo* des MDC, qu'entraîne l'injection de toxine diphtérique à des souris transgéniques exprimant le

récepteur de cette toxine sous le contrôle du promoteur de la molécule CD11c (un marqueur myéloïde), empêche l'induction de réponses CTL chez des souris soumises à une infection virale (270, 516). Ainsi, cette thèse s'est concentrée sur la caractérisation des MDC primaires et des altérations physiologiques qu'elles subissent dans l'infection VHC.

Nos travaux ont permis d'identifier des MDC de spécificités fonctionnelles différentes entre patients virémiques et avirémiques, de caractériser la nature de l'interaction virus-hôte et de démontrer la présence d'un défaut réversible dans la réception des signaux de danger transmis par la voie TRIF-dépendante. Ces résultats sont résumés en quatre points qui font l'objet d'une discussion indépendante: (1) les MDC périphériques sont infectées par le VHC; (2) le cas échéant, leurs fonctions ne se limitent pas au simple transport de l'antigène vers les ganglions drainants; (3) elles sont susceptibles d'exercer un contrôle négatif antigène-spécifique sur la qualité de la réponse adaptative CD8⁺; et (4) leur statut fonctionnel influence le taux de réponse objectif au régime thérapeutique ribavirine-IFN- α_2 . Finalement, nous aborderons comment l'environnement immunitaire intrahépatique bien qu'associé à l'induction de la tolérance périphérique, conserve sa capacité à soutenir des réponses efficaces contre des pathogènes viraux, et comment le VHC utilise ces propriétés immunologiques pour favoriser sa persistance chez l'hôte infecté.

1. Réservoir viral: infection des DC par le VHC

La discussion qui suit se concentre sur les résultats obtenus en lien avec la caractérisation d'un réservoir d'importance immunologique qui se constitue dans les DC périphériques chez des patients virémiques sans antécédents récents de thérapie antivirale. L'équipe de Onji (601) a montré que la circulation de DC infectées (contenant de l'ARN génomique) paraît très affectée sous ribavirine-IFN- α_2 , même lorsque la virémie ne diminue que de peu. Toutefois, la notion que la topologie des réservoirs est inchangée après traitement antiviral repose en partie sur l'hypothèse que la production virale n'est pas totalement inhibée par les antiviraux, ce qui permet l'infection de nouvelles cellules. Le profil habituel de la courbe effet-dose d'un

antiviral est peu compatible avec une inhibition à 100%. La multiplication résiduelle du virus ne peut donc être négligée. L'action des régimes antiviraux à base de ribavirine-IFN- α_2 aboutit plutôt à un nouvel état pseudo-stationnaire dans lequel la multiplication virale est diminuée de plusieurs ordres de grandeur, par exemple d'un facteur de 10^4 , ce qui est considérable (381). Cet état d'équilibre dynamique peut évoluer dans deux directions opposées: d'un côté, le contrôle total de la réplication virale par extinction progressive des microfoyers de multiplication virale, de l'autre, un nouvel état pseudo-stationnaire avec reprise de la réplication virale dans certains réservoirs si un virus résistant émerge lorsque le traitement perd de son efficacité (cas d'échec non-répondant). C'est manifestement ce type d'événement que l'on observe dans la grande majorité des cas VHC-infectés, avec la recrudescence de la charge virale plasmatique et du nombre de cellules immunitaires infectés, alors que ces deux paramètres étaient indétectables sous traitement. Les données les plus récentes viennent confirmer qu'il existe bien des microfoyers de multiplication virale résiduelle après traitement, alors même que la virémie plasmatique n'est plus détectable depuis plusieurs mois (461, 462, 477, 478). En effet, dans certains cas exceptionnels, par exemple chez des sujets convalescents à long terme après traitement (SVR répondant), la virémie plasmatique peut être très diminuée, en deçà des seuils de détection actuels (<50 copies d'ARN/ml), alors que la circulation de DC positif pour la présence d'ARN HCV reste paradoxalement détectable (461). Ce phénomène est sans doute attribuable à la présence d'une faible réplication intermittente mais soutenue au niveau du foie dans ces quelques cas (78). Toutefois, il est important de noter que des travaux longitudinaux récents sur des cohortes plus nombreuses n'ont pu confirmer ces observations sur l'existence de microfoyers de réplication qui persistent après la clairance virale (390). Une infection résiduelle chez des SVR n'est peut-être qu'un épiphénomène puisque la récurrence de l'infection est un événement très rare après immunosuppression (51). Les outils développés dans cette étude (qRT-PCR et essais fonctionnels) ont cependant permis une quantification et une caractérisation plus précises du devenir des DC infectées chez des sujets convalescents (avirémiques), chroniquement infectés sans historique de thérapie antiviral ou n'ayant pas répondu au traitement ribavirine-IFN- α_2 .

La détection d'ARN du VHC dans les DC périphériques (chapitre II) isolées de patients chroniquement infectés est conforme aux observations montrant que ce compartiment cellulaire contient sans ambiguïté le virus *in vivo* (195, 398, 600). Notamment, une quantité importante de l'ARN détectée est distribuée dans le compartiment des DC (isolés par FACS) en comparaison avec les niveaux détectés dans les échantillons de lymphocytes B tels que définis par l'expression de CD19 (5.2 vs. 4.7 log₁₀ copies d'ARN x10⁻⁶ cellules respectivement; figure 9), ce qui s'avère en nette opposition avec une série d'observations faites par des études antérieures (56, 664). Les travaux de Sung et al. (575) ont déjà montré que les lymphocytes B (définis dans notre étude comme CD3⁻14⁻19⁺CMH-II⁺) sont susceptibles de soutenir de façon transitoire une infection VHC répliquative *in vitro*. Ainsi, la présence des plus hauts niveaux d'ARN du VHC seulement dans les DC périphériques relativement à ceux quantifiés dans les échantillons originaux de PBMC (p<0.001; figure 9), souligne leur rôle en tant que l'un des sites réservoir de prédilection du virus dans la périphérie sanguine. Cependant, la capacité de mesurer une interaction spécifique entre le VHC et une cellule du système immunitaire par la détection de son génome par RT-PCR a été critiquée (619) et mise en doute puisqu'il est avancé que les molécules d'ARN détectées ne résultent peut-être que de l'adsorption de particules virales à la surface des cellules. Dans ce cas, les niveaux d'ARN VHC détectés devraient être proportionnels aux charges virales plasmatiques en raison d'une propensité accrue d'interactions d'origine non-spécifique entre virions ou débris d'hépatocytes infectés et cellules (corrélation positive). Or, nous n'avons trouvé aucune corrélation linéaire entre la charge virale plasmatique ou entre l'inflammation hépatique (ALT/AST) et les niveaux d'ARN viral mesurés par cellule (se référer aux chapitres II et III), ce qui vient confirmer que ce dernier paramètre ne paraît pas significativement influencé *in vivo* par la virémie ou la sévérité de l'hépatite. Ces données sont en accord avec notre affirmation que l'apparition de MDC défectueuses dans la périphérie (voir point 2) est le résultat d'une interaction physique spécifique entre le virus et les DC affectées plutôt qu'une conséquence de l'exposition de ces cellules à la pathologie qu'est l'hépatite C chronique.

Dans l'optique de montrer qu'il est vraiment question d'une permissivité des cellules immunitaires (c.-à-d. capacité à soutenir l'entrée et les premières étapes répliquatives du cycle de vie; se référer à la figure 2), les ARN extraits de PBMC CD14⁻ stimulés avec 3 µg/ml de phytohemagglutinine (PHA) et 200 U/ml d'IL-2 ont été récoltés à intervalle régulier sur une période de trois à sept jours et analysés pour estimer l'accumulation de l'ARN viral dans une population cellulaire en expansion. La persistance à court terme des ARN génomiques du VHC dans les PBMC stimulés (Tableau 9 & figure 21, en annexe) est en contradiction avec un effet de dilution cumulatif à mesure que la population cellulaire augmente par division, s'il n'y avait une faible répllication du génome pour compenser ce phénomène. Ces observations sont en accord avec des données similaires publiées pour des PBMC (460). De manière intéressante, cette persistance à court terme des ARN génomiques du VHC dans les PBMC stimulés coïncide avec la présence de transcrits viraux de polarité négative (I.G.R.G, G.B., R.-P.S. et D.L., données non publiées), en accord avec ce qui a été démontré par d'autres études (330). La détection de l'ARN de polarité négative n'est pas une preuve d'infection productive (c.-à-d. qui mène forcément à la production de virions néoformés), mais bien celle d'un marqueur biochimique qui révèle des événements récents de traduction et de répllication du génome viral (se référer à la section 1.1, chapitre I). Ces résultats, ainsi que l'inhibition de l'abondance du génome ARN du VHC dans des PBMC après traitement pharmacologique avec les inhibiteurs antiviraux BILN2061 et VIR235 (Tableau 6), indiquent une origine intracellulaire pour l'ARN viral amplifié par qRT-PCR et montrent clairement que les réservoirs hématopoïétiques existent d'une manière indépendante des interactions non-spécifiques (i.e. FcR, phagocytose d'hépatocytes apoptotiques infectés) soupçonnées par divers auteurs d'être à l'origine du signal détecté. Nos résultats fonctionnels (discuté ci-bas) indiquent qu'il est improbable que les réservoirs détectés ne soient finalement que des sites d'accumulation de particules virales par phagocytose ou par adsorption à la surface des DC au lieu de véritables sites d'association spécifique (se référer à la discussion du chapitre II). De plus, nos observations confirment qu'il y a une relation distincte entre le VHC et les cellules hématopoïétiques tel que précédemment suggéré par des études de

compartimentalisation (variants uniques) et d'hybridation *in situ* (418, 501). Par conséquent, la détection quantitative d'ARN génomique du VHC est un marqueur fiable d'une interaction infectieuse entre le virus et les cellules immunitaires de sujets infectés en conformité avec les propos de Michalak et ses collaborateurs qui détectent l'expression concomitante de la NS5A (par microscopie confocale) dans les PBMC ARN⁺ (459).

Une série d'arguments d'ordre taxonomique et empirique viennent aussi renforcer la notion que ce virus hépatotropique démontre *in situ* un tropisme pour les DC d'origine myéloïde. Notamment, l'infection des DC humaines de Langerhans ou dérivées de monocytes CD14⁺ sanguins (351, 648), via l'endocytose médiée par le récepteur CD209 (369, 421, 467, 508, 586), permet la réplication virale d'un virus apparenté, celui de la fièvre de dengue, dans ces hôtes cellulaires (317). De plus, Kaimori *et al.* (275) confirment *in vitro* le rôle des lectines de type C mannose-spécifique dans l'entrée du VHC et sa réplication dans des MDC circulantes. Conséquemment, les Mo-DC, qui expriment les récepteurs putatifs identifiés pour l'entrée du virus (se référer à la section 1.1.2, chapitre I), sont infectables par le VHC *in vitro* (3, 422). Ces observations démontrent le rôle que peuvent exercer les lectines comme CD209 dans le tropisme cellulaire du VHC et permettent d'étayer l'hypothèse sur la nature infectieuse de l'interaction entre les MDC et le VHC. Toutefois, le mécanisme par lequel le génome du VHC persiste *in vivo* sous la forme d'un réservoir au sein des DC n'est pas connu. Une hypothèse envisageable est que les progéniteurs hématopoïétiques des DC myéloïdes pourraient être infectés par le VHC dans le foie et, par la suite, transmettre l'infection à leur progénie. Ainsi, Sansonno *et al.* (515) ont montré par RT-PCR *in situ* et par cytométrie (détection de protéines virales) que les CD34⁺ isolés de la moelle osseuse ou de la périphérie sanguine de sujets VHC-infectés sont porteurs du virus *in vivo*, tout en étant le siège d'une réplication virale importante capable de soutenir *ex vivo* le déroulement du cycle viral complet. Pham *et al.* (461) rapportent également la détection d'ARN génomique (quoique à de faibles niveaux) dans des DC dérivées à partir des précurseurs monocytaires (Mo-DC). Dans ce contexte, le renouvellement des MDC circulantes infectées en périphérie à partir de la différenciation des précurseurs CD34⁺ ou CD14⁺

pourrait favoriser le maintien du réservoir observé à long terme. *In vivo*, il a été montré que le passage de monocytes CD14⁺ à travers l'endothélium vasculaire dans les tissus peut s'effectuer sous l'influence de stimulus proinflammatoires produits par l'injection intradermique d'antigènes particuliers, et aboutit à leur différenciation en MDC capables, après capture de l'antigène, de migrer dans les LN drainants (186, 257, 482, 505, 580). Par ailleurs, une toute autre hypothèse peut être émise selon laquelle les MDC recrutées dans le foie sont infectées lorsqu'elles captent des antigènes viraux et que l'on ne mesure qu'une fraction de ces cellules en recirculation vers les organes lymphoïdes. En somme, le réservoir dans les DC n'est peut-être pas un site de persistance prolongée du VHC sous forme infectieuse (site de production de virus) mais, avant tout, une cible cellulaire dans laquelle persiste un niveau détectable de transcription des ARN viraux qui signent des événements récents d'infection et de réplication favorisant son maintien à très court terme mais nécessitant une réinfection continue de nouvelles cellules transitant du foie aux organes lymphoïdes (et ce tant que le réservoir principal d'hépatocytes reste intact).

2. Immunité innée et réservoir VHC dans les DC: un flirt bénéfique?

Une des questions à l'origine de ce travail concernait la possibilité que la présence de ce réservoir dans les DC (décrits ci-dessus) conduise à une inactivation des fonctions innées de ces cellules. C'est cette question qu'aborde le chapitre II, et nos résultats, publiés récemment dans la revue *Journal of Virology* (496), démontrent que l'ARN du VHC détecté dans les DC exerce une influence négative sur la transduction des signaux provenant des récepteurs TLR3 (poly I:C) et TLR4 (LPS) exprimés par les MDC CD14⁻33⁺HLA-DR⁺ du sang de patients virémiques. Ces profils d'expression *ex vivo* obtenus par cytométrie pour l'IL-12 sont conformes à d'autres observations montrant que les MDC circulantes ont des réductions importantes de leur capacité à synthétiser cette cytokine dans le contexte de l'infection au VHC après engagement du TLR3 et TLR4 (19, 24, 122) ainsi que l'atténuation de la capacité des Mo-DC infectées *in vitro* à produire de l'IL-12 après stimulation avec le LPS (3). L'expansion du criblage par cytométrie de la capacité des MDC à s'activer en réponse à d'autres agonistes des TLR a mené à l'observation que la production de cytokines par le TLR8

(voie MyD88-dépendante) était intacte (Figure 14). L'expression conjointe d'IL-12 et de TNF- α suivant l'engagement des TLR3 et 4 analysés est inversement proportionnelle aux niveaux de molécules d'ARN du VHC détectés (Figure 16), suggérant que cette désensibilisation spécifique de la signalisation dose-dépendante de ces TLR pourrait être causée par l'expression de protéines du virus exprimées dans les MDC hôtes. D'ailleurs, l'un des rôles physiologiques de la protéase NS3/4A dans des cellules infectées est de prévenir l'induction d'IFN- β suite à la phosphorylation et l'activation d'IRF3 par la voie TRIF-dépendante du TLR3 (346). Or, la restauration de la sensibilité au LPS par traitement à l'inhibiteur BILN2061, alors que les réponses au TLR8 restent inchangées (c.-à-d. qu'elles étaient initialement intactes; figure 16), nous ont permis de démontrer que l'activité protéolytique de la NS3 et la réplication virale interfèrent directement avec l'activation de la voie TRIF-dépendante dans les MDC infectées de patients virémiques CP-D. Nous avons également noté l'amélioration des basses réponses des MDC après thérapie IFN- α_2 . Ces résultats fournissent une base moléculaire spécifique pour les observations antérieures du dysfonctionnement au niveau de la réceptivité du TLR3 chez les MDC.

L'activation préexistante (et continue) par stimulation d'antigènes viraux persistants peut désensibiliser les voies TLR à une restimulation subséquente (c.-à-d. qu'aucune cytokine n'est produite). Ceci pourrait se produire par des mécanismes négatifs de rétroaction, par exemple comme ceux médiés par les suppresseurs de la famille SOCS (382, 419) parmi d'autres (175). Une stimulation chronique *in vivo* par du LPS dans l'infection VIH mène également à une capacité réduite des monocytes de sécréter du TNF- α *ex vivo* après restimulation (66). En extrapolant à partir des travaux cités ci-dessus, on pourrait être porté à croire que la réduction du *fold-change* dans l'activité des TLR3 et 4 suivant leur stimulation résulte d'une sécrétion basale élevée en cytokines due à une activation chronique provenant du contexte inflammatoire lié à l'infection VHC. Or, nous n'avons trouvé aucune différence significative dans les niveaux basaux d'IL-12 ou de TNF- α entre les sujets VHC⁻ et VHC-séropositifs ($p=0.72$, $n=6$ VHC⁻, $n=31$ VHC⁺; données du chapitre III); à la place, nous avons observé la production significative d'IL-6 après stimulation au LPS dans le sous-

groupe CP-D (Figures 12 et 16), ce qui infirme l'idée d'une désensibilisation due à une stimulation chronique. L'observation récente que le VHC induit l'expression d'IL-10 (24), une cytokine immunomodulatrice qui régule négativement la production d'IL-12 dans les MDC, est une explication à envisager pour nos résultats. Toutefois, cette explication *a priori* simple, qui impliquerait la surexpression d'inhibiteurs anti-inflammatoires à large spectre (ex. IL-10) en raison de pathologies secondaires à l'infection, ne paraît pas être en cause puisqu'un tel mécanisme de rétrocontrôle négatif devrait avoir comme conséquence l'inhibition généralisée des signaux issus de la reconnaissance des PAMP par de multiples TLR, contrairement à une inhibition restreinte à la seule activation de la voie TRIF-dépendante comme observée (Figures 14 et 15).

L'ensemble des résultats présentés ici ne sont pas conformes à l'idée d'une diminution systémique de la réponse des TLR à travers tous les types cellulaires et voies de signalisations PRR connues (du moins celles étudiées), mais plutôt avec l'idée d'une inhibition spécifique de la détection des agonistes empruntant la voie de signalisation TRIF-dépendante dans les MDC infectées puisque les monocytes restent fonctionnels (Figure 12). Les signaux originant de la reconnaissance des IFN de type 1 (α/β) sont exigés pour l'activation des DC après l'engagement du TLR3 par du poly(I:C) ou une infection virale répliquative (via la voie RIG-I/IPS-1). En effet, les DC issues de souris $IFNAR1^{-/-}$ sont altérées dans leur capacité à induire la transcription des gènes $TNF-\alpha$ et IL-12 p40 après une infection avec le virus NDV, pendant que leur capacité à migrer vers les organes lymphoïdes pour donner le signal costimulateur n'est aucunement affectée – l'expression de CCR7 et CD86 étant comparable à celle des souris sauvages (235). Contrairement à l'IL-6 (cytokine que le VHC n'inhibe pas; chapitres II et III), la synthèse d'IL-12 et de $TNF-\alpha$ est également diminuée dans des souris $TRIF^{-/-}$ (312, 660) ou $STAT1^{-/-}$ (181, 278). STAT1 est une composante signalétique essentielle à la cascade découlant du $IFNAR$ (562). Quelques travaux récents dans des modèles hépatiques ont montré que les protéines du VHC (c.-à-d. Core, NS3/4A) réduisaient l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 (55) en incitant sa dégradation par le protéasome (355). De toute évidence,

l'interférence avec TRIF (ou STAT1) explique la dichotomie en terme de réponse des cytokines (IL-6 vs. IL-12/TNF- α) observée dans les MDC infectées avec le VHC.

En somme, l'originalité des travaux présentés dans le cadre de cette thèse (chapitre II et III) est que l'infection des MDC n'interfère qu'avec la reconnaissance par les TLR TRIF-dépendant (c.-à-d. le 3 et le 4) et que ces derniers transduisent un signal d'activation dont on sait néanmoins qu'il entraîne une activation incomplète de la MDC qui n'est en aucun cas suffisante pour induire la production de certaines cytokines inflammatoires (IL-12 et TNF- α). Ces données sont importantes à plusieurs égards. En premier lieu, elles permettent peut-être d'expliquer pourquoi les défauts de l'immunité adaptative caractéristiques de l'infection chronique sont pour la plupart dirigés contre des antigènes du VHC (ce phénomène sera discuté dans la section suivante). On peut en effet envisager que les MDC de patients CP-D, à l'instar des DC inactives décrites dans des modèles murins, amorcent un cercle vicieux conduisant à la tolérance de la réponse adaptative anti-VHC; la décision entre l'activation d'une réponse immunitaire versus sa tolérogénéisation paraît compter sur le statut actif des TLR dans ces CPA, la tolérance étant renversée quand les TLR sont activés (325). En second lieu, ces données apportent la clé du mode d'action, jusque-là inconnu, du mécanisme viral qui atténue la réponse au poly(I:C) et au LPS.

3. Conséquence(s) physiologique(s) sur la réponse adaptative, particulièrement la dimension CTL

Dans cette pathologie, il est important de noter qu'une image très partielle émerge quant à la contribution relative des MDC dans l'échec ou non de la réponse immune. Nous avons déjà mentionné que le phénotype CP-D affiché par les MDC contenant du VHC convertit probablement une rencontre avec une cellule T en un événement de tolérance strictement spécifique de l'antigène et récessive, c'est-à-dire que cette tolérance ne concernerait que les cellules T qui ont effectivement reconnu des peptides sur des DC inactives (se référer à la section 4, chapitre I). Des défauts d'origine virale qui compromettent les fonctions innées des MDC infectées peuvent représenter une adaptation évolutive qui favorise (avec d'autres facteurs, ex. PD-1) l'établissement d'une infection chronique chez un hôte autrement immunocompétent

et la coexistence hôte-parasite prolongée. Or, pour expliquer la spécificité du défaut de l'immunité adaptative anti-VHC, certains auteurs ont cru devoir écarter les DC, bien que des signaux originant de ces dernières puissent être essentiels pour l'activation des cellules T, en invoquant qu'un tel mécanisme de persistance virale exigerait l'infection d'un pourcentage significatif de DC *in vivo* (loin du 0.1% à 1% rapporté pour le sang) et que cela mènerait invariablement à une immunosuppression généralisée. Nous avons toutefois montré que cette argumentation est infondée (même si cela a été beaucoup répété) puisque, entre autres raisons, les défauts observés ne sont pas une conséquence passive de pathologies secondaires à l'infection chronique tel que proposé par ceux qui souscrivent à la thèse minimisant l'importance d'une interférence avec les fonctions innées des MDC.

Les TLR3 et 8 exprimés par des MDC agissent principalement comme senseurs de pathogènes viraux, identifiant, d'une manière généralement réplication-indépendante, des motifs moléculaires conservés dans l'ARN génomique des virus (463). Récemment, l'activation de MDC par la reconnaissance directe de PAMP (qui habituellement sont associés de façon covalente à l'antigène duquel ils dérivent) plutôt que l'activation indirecte par des cytokines inflammatoires (ex. TNF- α) a été montrée comme un prérequis incontournable *in vivo* pour qu'il y ait induction d'effecteurs mémoire T fonctionnels (429, 561). En fait, on sait maintenant que l'activation indirecte des MDC, qui n'ont pas encore rencontré l'agent pathogène (donc d'antigènes), a pour conséquence d'abroger leur participation à la présentation d'antigènes, principalement en arrêtant la captation des antigènes exogènes par phagocytose et en empêchant la formation de nouveaux complexes CMH-II-peptide (644, 662). Ainsi, dans le scénario de l'infection VHC, l'inactivation de la voie TRIF-dépendante dans des MDC à la suite d'interactions physiques avec le virus devrait n'avoir aucune conséquence délétère sur l'homéostasie globale du système adaptatif parce que le nombre de MDC circulantes qui répondent à un pathogène donné (c.-à-d. présentant les antigènes viraux d'intérêts) est probablement petit si nous considérons que toutes les MDC présentant des antigènes VHC devront avoir d'abord été en contact direct avec les composants du pathogène, ouvrant ainsi la voie à une attaque de leurs fonctions innées par la NS3/4A. Les résultats présentés ci-dessus confirment

la présence de MDC dysfonctionnelles infectées par le virus dans quelques sujets virémiques (c-à-d. le sous-groupe CP-D) et démontrent que les fréquences globales de MDC dysfonctionnelles sont considérablement restreintes (estimées à <3% des DC sanguines; chapitre II), indiquant l'absence de défauts globaux dans la reconnaissance innée des signaux de danger. Par conséquent, chaque rencontre d'un pathogène laisse certainement assez de DC prêtes à répondre dans la périphérie à de nouvelles agressions par d'autres agents infectieux. Nos observations fournissent un appui empirique à un modèle actuellement peu privilégié dans lequel l'affaiblissement viro-induit de l'immunité innée à l'échelle des DC participerait à l'échec de l'immunité adaptative VHC-spécifique (64); dans ce modèle, la qualité des réponses CD4/CD8 virus-spécifiques est contingente sur la capacité des DC à intégrer l'information issue du système inné et de la présenter aux lymphocytes T. Nous avons pu préciser ces notions dans de récents travaux réalisés sur les CD8⁺ sécrétant des cytokines et mobilisant CD107a en réponse aux peptides 18-mer de NS3 ou NS5B chez des patients virémiques où les MDC sont fonctionnelles (CP-N). Cela constitue une des premières analyses fonctionnelles précises de signaux soutenus délivrés par les MDC chez l'être humain, et nécessaires à la fonction des cellules CD8⁺ (voir ci-bas).

Divers auteurs ont souligné le rôle indispensable de l'IL-12 et/ou de l'IFN- β dans l'expansion clonale et l'activation fonctionnelle optimale des lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques (86, 108, 109, 111, 300, 339, 524, 525, 614). Ainsi, l'inhibition de la transcription de gènes TLR-inductibles comme l'IL-12 et le TNF- α dans des MDC infectées suggère que celles-ci sont défectueuses *in vivo* dans leur capacité à potentialiser une réponse CD8⁺ antigène-spécifique de haute qualité (c-à-d. expression par le même CTL de ≥ 3 fonctions simultanées). L'observation d'une corrélation positive entre le potentiel fonctionnel des MDC et la qualité des effecteurs CD8⁺ VHC-spécifiques chez les sujets virémiques de type CP-N est en accord avec cette idée (Figures 18 et 20). À la différence du VHC, les fréquences ainsi que la sécrétion d'IL-2 par les CD8⁺ CEF-spécifiques (réponse dirigés contre des infections immuno-contrôlées) ne sont pas corrélées avec l'expression de PD-L1 (voir ci-bas pour une discussion du rôle de cette molécule) ou avec les facteurs qui prédisent la

fonctionnalité des MDC dans les sujets VHC-séropositifs, fournissant une preuve que l'affaiblissement sélectif du potentiel inné des MDC suite à une infection mène à une immunorégulation pathogène-spécifique de la qualité de la réponse adaptative (Figure 20). Le fait que des réponses $CD8^+$ CEF-spécifiques ont été induites normalement dans les sujets virémiques CP-D (Figure 18) prouve clairement que le phénomène que nous décrivons est un épuisement récessif et antigène-spécifique des fonctions effectrices des $CD8^+$ qui est dû en partie à la capacité du VHC d'inactiver directement les éléments spécifiques de l'immunité innée qu'organisent les MDC. Ce constat est en conformité avec les données publiées par d'autres chercheurs qui démontrent que la présentation d'antigènes par des DC inactives résultent dans l'amortissement ou l'activation abortive des fonctions effectrices antigène-spécifiques des lymphocytes $CD8^+$ répondants (107, 110, 127, 128, 400, 425, 470, 471, 656). Plusieurs explications peuvent être proposées quant aux causes expliquant ces observations, l'une d'elle pouvant être que les cytokines inflammatoires secrétées par les MDC activées (IL-12 et autres facteurs encore inconnus) agissent comme facteur de survie soutenant l'expansion de cellules $CD8^+$ IL-2⁺ polyfonctionnelles nouvellement activées puisqu'il a été montré qu'elles peuvent réguler à la hausse l'expression de la sous-unité α de l'IL-2R (246), réguler l'activité de p27^{Kip} (668) ainsi que celle de Bcl-3 (615) ou, indirectement, en préservant une aide $CD4^+$ antigène-spécifique (69, 96, 292, 448).

La présence d'une activité $CD4^+$ auxiliaire antigène-spécifique est un facteur important qui influence la qualité de la mémoire $CD8^+$ (se référer à la section 2.3.1, chapitre I). Par exemple, la présentation d'antigènes VHC dans la phase aigüe en absence d'une aide $CD4^+$ spécifique mène à la tolérance des $CD8^+$ VHC-spécifiques (199), tandis que ces mêmes cellules sont normalement activées en présence de $CD4^+$ (553). Il a été montré que des DC produisant des niveaux augmentés d'IL-12 étaient impliquées dans la restauration de la réceptivité de $CD4^+$ tolérantes de même que dans le renversement de la tolérance systémique (91). Aussi, nous pouvons avancer qu'un tel mécanisme de tolérance est l'une des stratégies exploitées par ce virus pour induire l'effondrement des réponses $CD4^+$ et $CD8^+$ sur lesquelles repose la protection et, ainsi, favoriser sa persistance chez l'hôte. Mais l'épuisement fonctionnel des

effecteurs CD8⁺ ne peut expliquer à lui seul, et de façon satisfaisante, la persistance (Figure 18). Effectivement, il ne s'agit pas que d'un épuisement fonctionnel dû à une antigénémie élevée puisque les effecteurs CD8⁺ IFN- γ ⁺ virus-spécifique restent détectables *ex vivo* dans des modèles de maladie virale chronique à haute virémie (LCMV (177), VIH (404)) alors qu'ils sont généralement absents de la périphérie lors d'une infection au VHC. Aussi, l'échec de l'expansion des effecteurs par la voie PD-1/PD-L1 (décrit ci-bas) pourrait jouer un rôle, en synergie avec l'épuisement fonctionnel, dans la faible fréquence de cellules CD8⁺ VHC-spécifique détectées chez les individus virémiques.

Les résultats de l'article présenté au chapitre III indiquent également qu'un nombre significatif de lymphocytes CD8⁺ NS3 ou NS5B-spécifiques activés sont polyfonctionnels ($\approx 20\%$ avec ≥ 2 fonctions effectrices simultanées; figure 18), ne sont pas anergisés ou éliminés chez les cas virémiques CP-N, et pourtant sont dénués de tout effet sur le contrôle de la virémie, ce qui suggère peut-être l'existence d'un deuxième palier de tolérance qui s'effectue par un autre mécanisme. On sait que la fonction des CD8⁺ est régulée par des molécules costimulatrices et coinhibitrices exprimées sur les MDC présentant les antigènes. L'un de ces régulateurs inhibiteurs est PD-L1 (se référer à la discussion sur la voie de rétrocontrôle PD-1/PD-L1 à la section 2.2.2, chapitre I). La surexpression de PD-L1 à la surface des CPA (Figure 19) corrèle avec la diminution du nombre de CD8⁺ VHC-spécifiques détectées, mais ne semble avoir qu'un effet marginal sur leurs capacités fonctionnelles effectrices lors de l'infection chronique (Figure 20). En effet, après déclenchement d'une thérapie antirétrovirale HAART, l'expression de PD-1 diminue sur les CD8⁺ VIH-spécifiques (116), mais cette *downregulation* n'améliore pas directement la fonctionnalité des CD8⁺ virus-spécifiques préexistants (46), un rôle qui est attribué ici aux MDC fonctionnelles. Ces données, une fois combinées avec l'observation que l'effet principal du blocage de PD-1 chez les souris et l'être humain est sur la prolifération antigène-spécifique des CD8⁺ (32, 282, 456), indiquent qu'une dérégulation du cycle cellulaire par PD-1/PD-L1 peut limiter l'efficacité antivirale des réponses CD8⁺ polyfonctionnelles anti-VHC en diminuant leur potentiel d'expansion clonale comme

c'est le cas pour le VIH (404) et le VHC (420). Cette hypothèse, qui fournit un mécanisme pour expliquer l'incapacité des réponses CD8⁺ VHC-spécifiques des patients CP-N à efficacement contrôler la virémie en dépit de la présence de MDC fonctionnelles, fait présentement l'objet d'une nouvelle étude. À l'appui de cette hypothèse, la numération des CD8⁺ VHC-spécifique, bien que significativement augmentée chez la plupart des patients CP-N (qui expriment des niveaux de PD-L1 équivalents à ceux de sujets CP-D), demeure à des fréquences modestes n'excédant pas 0.2% par antigène. Cela conforte l'idée que, même dans un contexte CP-N, l'infection chronique n'atteint pas chez la majorité des patients le seuil quantitatif de CD8⁺ VHC-spécifique nécessaire pour contrôler la virémie. En somme, nos résultats indiquent deux points de contrôle critiques par lesquels les interactions VHC/MDC semblent empêcher le renouvellement d'un répertoire CD8⁺ VHC-spécifique fonctionnellement compétent pendant la maladie chronique: (1) un blocage de la qualité (polyfonctionnalité) des réponses CD8⁺ antigène-spécifiques par l'évasion de l'activation TRIF-dépendante de l'immunité innée; (2) la régulation du nombre d'effecteurs CD8⁺ dans les tissus par PD-1/PD-L1. Le contrôle de l'infection chronique semble donc un phénomène dynamique où non seulement la réponse immunitaire adaptative mais aussi la réponse immunitaire innée à l'échelle des MDC pourraient jouer un rôle important.

4. La leçon des CP-N: prédire l'efficacité éventuelle des stratégies thérapeutiques antivirales en développement

Un des principaux arguments pour l'utilisation d'une immunothérapie ciblant PD-1 pour lutter contre le VHC (ou d'autres pathologies virales chroniques) est qu'elle peut lever l'inhibition de la prolifération permettant l'expansion de nombreux CD8⁺ virus-spécifiques (171). Mais, comme nous l'avons vu, elle ne pourra pas altérer seule les autres fonctions de ces effecteurs. Il est certes valable, d'un point de vue thérapeutique, d'induire *in vivo* l'expansion d'une quantité considérable de lymphocytes T spécifiques avec une avidité élevée contre les antigènes du VHC pour repeupler la périphérie (553), mais il est probable que la qualité de la réponse immunitaire (persistance d'une mémoire polyfonctionnelle), plutôt que simplement son ampleur, s'avère être un paramètre plus critique au succès d'une thérapie pour

lutter contre l'infection chronique (114, 143). En fait, la présence de hautes fréquences de lymphocytes CD8⁺ anti-VIH-1 circulant chez l'hôte infecté n'est pas garante d'une résolution clinique contrairement à sa polyfonctionnalité (13, 218). En outre, les patients 31 et 44 (avirémiques) aussi bien que le patient CP-N 55 (répondeur), qui ont tous résolu ou contrôlé leur infection VHC, avaient $\geq 1\%$ de la réponse CD8⁺ VHC-spécifique pour un antigène donné exprimant quatre fonctions simultanément (IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺CD107a⁺), suggérant que la présence de CD8⁺ polyfonctionnels est un facteur qui influence le taux de réponse aux antiviraux standards (c.-à-d. IFN- α /ribavirine) dans l'infection au VHC. Dans ce cadre, les CD8⁺ VHC-spécifiques de haute qualité fonctionnelle (c.-à-d. IL-2⁺) pourraient parvenir à survivre à la thérapie dans des sujets CP-N pendant la période où le principal réservoir infectieux (et antigénique) diminue, de ce fait inclinant l'équilibre en faveur de l'hôte contre le virus: pour répondre rapidement aux situations de rebond réplicatif et en cas d'échappement après une période transitoire de contrôle de la virémie, ou afin d'éliminer complètement le virus, des niveaux élevés de cellules mémoires CD8⁺ VHC-spécifiques polyfonctionnelles préexistantes sont probablement requis *in vivo*. Or, des études chez la souris montrent que la thérapie antivirale à base de ribavirine contribue à la préservation de CD8⁺ polyfonctionnelles, notamment en modulant l'expression de PD-1 et de l'intégrité fonctionnelle des DC (67, 68). Puisque cela semble être également le cas chez l'être humain pour le VHC (601, 611), on peut envisager que la thérapie conventionnelle à base de ribavirine-IFN- α_2 ne nécessite pas forcément sa conjugaison avec des anticorps anti-PD-L1, ce qui éviterait d'exposer les patients au risque de complications autoimmunes associées avec la neutralisation non-spécifique de l'axe PD-1/PD-L1.

Les résultats discutés ici suggèrent également la possibilité que les inhibiteurs protéasiques comme BILN2061 puissent avoir un mécanisme d'action thérapeutique double, c'est-à-dire supprimer la réplication du VHC en empêchant le *processing* post-traductionnel de la polyprotéine, tout en libérant de manière concomitante la réponse innée des MDC de l'hôte du blocage imposé par l'interférence de la NS3/4A avec la voie d'activation TRIF (et probablement IPS-1)-dépendante. Dans le contexte

de la thérapie antivirale à base d'IFN- α_2 (qui n'est efficace que dans $\leq 50\%$ des cas infectés avec le VHC de génotype 1), la dégradation protéolytique d'IPS-1 par la NS3/4A atténue certainement la boucle d'amplification RNaseL/RIG-I, dont le rôle est d'augmenter les niveaux ainsi que la diversité des ISG induits par les IFN de type I que les cellules emploient pour contrôler l'infection du VHC (378). Un tel mécanisme limite probablement l'efficacité des thérapies conventionnelles à reconstituer en périphérie les fonctions innées des MDC chez les patients virémiques CP-D. Ainsi, il est envisageable que le statut CP-N de quelques sujets virémiques reflète physiologiquement une capacité à mieux répondre à un régime thérapeutique ribavirine-IFN- α_2 . De fait, cette prédiction est expérimentalement soutenue par l'efficacité et la rapidité remarquables (dès la 8^e semaine) avec lesquelles des patients CP-N recevant un régime thérapeutique d'IFN- α_2 en combinaison avec de la ribavirine ont éliminé leur virémie, par opposition aux sujets présentant un phénotype CP-D, qui pour la majorité, se sont avérés être des cas d'échec non-répondants (étude en cours et tableau 8). Le ciblage de l'interface NS3/4A-IPS-1 par des antiviraux protéasiques (avec le résultat final similaire à celui d'un phénotype CP-N) peut donc potentiellement améliorer (voir même remplacer) le mode d'action des IFN dans les cas d'échec au traitement en accroissant à la fois l'efficacité de l'immunité innée et celle des réponses CD8⁺ cytotoxiques. Cette étude apporte pour la première fois des arguments immunologiques justifiant la poursuite des essais de thérapie à base d'inhibiteurs de protéase pour le traitement du VHC. Toutefois, des questions importantes restent à résoudre pour développer des protocoles plus sûrs et plus efficaces. Ainsi, le rôle que jouent les lymphocytes T polyfonctionnels, de même que le bénéfice de cette stratégie à empêcher la surexpression de PD-1 dans ces essais, doivent être précisés. Ce sont les hypothèses qui font maintenant l'objet de nouvelles études puisqu'elles regorgent d'implications thérapeutiques importantes.

5. Le foie: quand devoir de conciliation tolérance/immunité facilite la persistance du VHC

Le foie est un organe connu pour ses fonctions métaboliques de synthèse, de stockage et de détoxification. En occupant une position centrale entre le système circulatoire

veineux du tractus gastro-intestinal et systémique, le foie reçoit 75% de son apport sanguin directement de la veine porte. En conséquence, il est continuellement exposé tant aux antigènes d'agents pathogènes qu'aux pro-biotiques et antigènes alimentaires entrant via l'intestin. Le foie est ainsi obligé d'agir également en tant qu'organe immunitaire complexe, fonctionnant selon le cas comme un site susceptible d'induire des réactions immunitaires efficaces contre les pathogènes ou d'assurer la tolérance périphérique envers les antigènes du soi/inoffensifs. Les facteurs déterminant cet équilibre sont peu clairs: en particulier, bien que l'on ait proposé une variété de mécanismes pour expliquer les propriétés tolérogéniques du foie (475), le mécanisme par lequel ce phénotype peut être inversé pour permettre des réactions immunitaires intrahépatiques fonctionnelles est incertain. Cependant, la preuve expérimentale récente que le foie agit comme un site d'activation primaire des $CD8^+$ naïfs menant à la formation de CTL fonctionnels dans un cadre d'exposition aiguë à un antigène permet l'élaboration d'un nouveau modèle qui pourrait expliquer, au moins en partie, comment des réponses immunitaires divergentes sont produites dans cet organe. Ici, nous discuterons brièvement des moyens par lesquels la tolérance intrahépatique peut être générée et comment l'équilibre entre ce résultat et l'immunité peut être en fait déterminé par les DC, tout en spéculant sur la signification clinique possible de tels mécanismes sur la résolution d'une infection au VHC.

L'activation incomplète de $CD8^+$ naïfs (absence de fonctions cytotoxiques) et la mort cellulaire prématurée de ceux-ci dès les premiers jours après activation a été rapportée quand l'antigène est exprimé par des hépatocytes (agissant comme CPA) (63). Si cela devait s'avérer une propriété généralement vraie pour tout antigène présenté dans le foie, cela impliquerait que l'échec de l'immunité dans certaines infections chroniques non-cytopathiques, comme le VHB et le VHC, serait dû au fait que la présentation d'antigènes par les cellules parenchymales du foie (ex. hépatocytes, LSEC) ne fournissent pas l'ensemble des signaux costimulateurs requis pour une activation complète des $CD8^+$ (signal de survie proportionné et adéquat). Cependant, l'expression continue d'un antigène transgénique (principal modèle utilisé pour sonder les propriétés présentatrices du foie) est connue pour induire des T régulateurs (17, 264, 268) qui peuvent affecter l'activité de précurseurs non tolérants

n'ayant pas été supprimés par sélection négative dans le thymus, créant ainsi un mécanisme alternatif de tolérance. En raison de ce mécanisme, une souris transgénique exprimant un Ag tissu-spécifique est plus exactement un modèle représentatif de tolérance au soi, plutôt que d'immunité à un antigène infectieux. Donc, la régulation négative des réponses naïves CD8⁺ intrahépatiques rapportée pour un antigène hépatique transgénique (43, 65) pourrait simuler les mécanismes de tolérance au soi et le contrôle de réactivité autoimmune plutôt qu'être la démonstration de l'incompétence immunologique du parenchyme du foie à présenter des antigènes dérivés d'un pathogène dangereux.

Il est généralement admis que l'activation de l'aide CD4⁺ est dépendante de la présence des signaux costimulateurs transmis par des DC matures présentant l'antigène dans les LN régionaux et que cette activation ne se produit jamais à l'extérieur des organes lymphatiques (254). Dans le cas du *priming* des CD8⁺, les besoins absolus en costimulation sont moins bien établis. En fait, dans des souris *Cd28*^{-/-} infectées avec LCMV la différenciation complète en CTL est observée (535). *In vitro*, il est possible d'induire l'activation et la différenciation de CD8⁺ en CTL par des tétramères CMHp-I, et ce en dépit d'un manque de molécules costimulateurs (622). À partir des études citées précédemment, il peut être avancé que les caractéristiques costimulateurs des DC sont facultatifs pour ce qui est du *priming* CD8⁺. Les travaux du groupe de Crispe dans lesquels ils montrent que l'activation complète de CD8⁺ naïfs intrahépatiques peut avoir lieu indépendamment des LN est compatible avec cette vision de l'initiation d'une réponse CD8⁺. L'activation aigüe et la différenciation complète de CD8⁺ naïfs en CTL par les cellules parenchymateuses du foie fut démontrée par la présence d'une cytotoxicité spécifique jusqu'au jour 6 après l'injection du peptide activateur dans un modèle de transplantation hépatique dépourvue de microchimérisme où la souris B6.C-H2^{bm8} récipiendaire du greffon est incapable de présenter le peptide SIINFEKL sur le CMH-I (294). Ce résultat, confirmé dans un modèle d'infection restreint aux hépatocytes (649), est un argument clé contre l'idée que la base du mécanisme permettant la tolérance de la réponse CTL dans le foie est l'enclenchement d'un programme d'activation intrahépatique défectueux lorsque des CD8⁺ naïfs rencontrent leurs antigènes spécifiques présentés

par les cellules hépatiques. Puisque le modèle expérimental de Crispe *et al.* (295) dépend de la présentation intrahépatique d'un peptide CMH-I par des cellules non-hématopoïétiques, ce modèle exclut la participation de l'aide CD4⁺ qui est essentielle à la génération d'une mémoire CTL compétente de longue durée. Sans aide, le développement et la survie des CTL en mémoire se détériorent (voir section 2.3.1, chapitre I); donc, il est juste de supposer que les CD8⁺ étudiés par Crispe *et al.* seront incapables de se différencier en mémoire fonctionnelle à moins qu'une aide CD4⁺ antigène-spécifique ne leur soit fournie. Ainsi, la finalité et la qualité d'une réponse CD8⁺ intrahépatique pourraient être déterminées par: si l'activation primaire est restreinte à l'environnement tolérogénique du foie (CD8⁺ sans aide); ou, si une immunité CD4⁺ est également incitée par la rencontre d'antigènes présentés par des MDC activées transitant du foie vers les LN (CD8⁺ aidé). Ces découvertes soutiennent un nouveau modèle d'interactions hépato-immunitaires, avec des implications pour notre compréhension de la nature paradoxale des propriétés immunologiques du foie. En l'absence de DC activées (recrutées ou résidant dans le tissu), l'équilibre entre tolérance et immunité dans le foie peut être décentrée vers la tolérance (104), permettant de ce fait à certains pathogènes d'éluder la détection immunitaire (voir ci-bas).

Je propose que les DC hépatiques sont les cellules qui intègrent les facteurs exogènes et environnementaux du foie pour contrôler le sort final de l'activation d'une cellule CD8⁺ intrahépatique à son antigène de façon à ce que l'homéostasie tissulaire soit maintenue. Le TGF- β et l'IL-10 sont des candidats à cette activité modulatrice microenvironnementale, ces cytokines étant produites constitutivement par beaucoup de cellules hépatiques (340, 593), y compris les macrophages Kupfer et les cellules endothéliales des sinusoides. De plus, de récentes études indiquent que les cellules stromales des muqueuses (et du foie (49, 658)) produisent de façon cyclo-oxygénase 2 (COX2)-dépendent la prostaglandine E₂ (PGE₂) sous l'influence des niveaux physiologiques de LPS (1-20 pg/ml) auxquels l'intestin et le foie sont continuellement exposés après absorption par l'iléon terminal (426, 427). Les DC elles-mêmes pourraient également produire de la PGE₂ par COX2 en réponse à cette exposition continue au LPS une fois résidant dans les tissus affectés (220). Puisque la PGE₂ est

reconnue pour polariser la différenciation des DC résident dans les tissus vers un phénotype inhibiteur IL-10⁺IL-12⁻, cela aiderait à expliquer la prédominance de DC tolérogéniques dans le foie normal. Cependant, quoique l'environnement immunologique du foie semble faire de grands efforts pour assurer que la tolérance est la réponse par défaut à l'antigène, il est important de souligner que cela ne constitue pas un phénotype fonctionnel irréversible des DC hépatiques (ou du foie); le système immunitaire local réussit à monter des réactions immunitaires protectrices lorsque confronté à une agression pathogénique. Semblable aux DC quiescentes présentes dans le sang, dans les voies respiratoires ou dans les plaques de Peyer, les DC hépatiques peuvent produire de l'IL-12 une fois activée par les stimuli appropriés (TLR3, TLR4 etc) (350, 549). En outre, l'activation des DC hépatiques par l'action des ligands du TLR3 [poly(I:C)] ou du TLR9 [CpG ODN 2216]) empêche la tolérance qui est induite en exprimant la gp1-60 de LCMV comme transgène hépatique sous le contrôle du promoteur d'albumine chez la souris (324). Ainsi les signaux de danger qui sont libérés par les pathogènes locaux peuvent surmonter le statut par défaut du système immunitaire du foie, en augmentant le recrutement de DC provenant du sang (310, 521, 659) et en permettant l'activation des DC résidentes, actions nécessaires pour favoriser l'initiation d'une immunité productive modulée par des CD4⁺ lorsque celle-ci est requise.

Un corollaire à cette théorie concerne les agents infectieux chroniques qui se répliquent dans les DC sans induire l'activation de celles-ci, tel que le VIH-1 et plus récemment le VHC. Le VHC peut de ce fait exploiter les propriétés immunologiques du foie et sa propre capacité à inactiver les DC (Figure 16) pour retarder l'initiation d'une réponse CD4⁺ dans les LN. Le VHC est non-cytopathique et le virus se réplique rapidement dès les premières semaines de l'infection (64). Lors de cette période, il est probable que le foie constitue l'emplacement prédominant de la présentation d'antigènes viraux où les CD8⁺ (mais pas les CD4⁺) VHC-spécifiques qui rencontreraient leurs antigènes pendant cette phase de l'infection subiraient une activation en effecteurs CTL médiée par des hépatocytes infectées en l'absence d'une aide auxiliaire, les conduisant à une délétion éventuelle. Puisque cette voie

d'activation par des CPA non-professionnelles semble principalement affecter les CD8⁺ à haute avidité dans le foie (65), ces derniers pourraient être préférentiellement recrutés à ce destin fatal. Les quelques lymphocytes VHC-spécifiques qui subiraient leur activation par des DC non-infectées effectuant de la présentation croisée dans les LN, certainement à une étape plus tardive de l'infection, seraient probablement des lymphocytes d'avidité inférieure, et, comme il a été observé pour d'autres infections, ces cellules à faible avidité sont incapables d'assurer la clairance virale (11, 126, 555). Dans les cas de persistance de l'antigène au-delà d'une fenêtre aiguë en raison d'un nombre insuffisant de DC activées tôt lors de l'infection, cette immunoréaction serait probablement sujet, avec le temps, aux systèmes régulateurs exposés précédemment (CD8⁺ sans aide et T régulateurs), aboutissant en fin de compte à la tolérance (coexistence) vis-à-vis la source antigénique. De façon intéressante, le VHB est un virus *stealth* (discret) qui n'infecte pas (587, 606), ni active les DC, conséquemment ce qui est décrit ici devrait aussi s'appliquer à ce virus persistant hépatotrope qui passe inaperçu par le système inné (636). Ainsi, le modèle proposé peut expliquer l'immunoréaction initiale dans les infections virales hépatites précédant l'étape chronique; il expliquerait également l'occurrence d'une alloréaction limitée immédiatement après la transplantation d'un foie avant que la tolérance ne soit établie (105). Chez le sous-groupe d'individus qui contrôle spontanément ces infections, il est possible que la présentation croisée efficace d'antigènes viraux se produise dans les LN dès les premiers moments de l'infection, évitant ainsi l'induction intrahépatique de CD8⁺ sans aide CD4⁺ auxiliaire. Alternativement, dans ces individus, l'évasion habituelle de l'immunité innée par le VHC ou la nature *stealth* du VHB pourraient être annulées, menant ainsi à une réponse inflammatoire rapide du foie et le renversement de la tolérance intrahépatique grâce à l'activation d'une aide CD4⁺ virus-spécifique robuste par les DC. Des tétramères CMHp-II utilisés dans des patients CP-D comparativement aux CP-N pourraient permettre l'exploration de la fonction et du destin des CD4⁺ VHC-spécifiques dans le cadre de DC inactivées par un virus et apporter ainsi une confirmation de ce modèle chez l'être humain.

Comme décrit précédemment, les DC sont au cœur des décisions de l'immunité; par exemple, une DC quiescente (au repos ou inactivée par un virus) qui présente à un

lymphocyte T son antigène spécifique anergise ce lymphocyte au lieu de le stimuler (565). Il n'y aura réponse que si à la fois le lymphocyte T et la DC reconnaissent l'antigène. Celui-ci se doit d'être accompagné de signaux de danger, qu'ils soient endogènes (stress cellulaire inhabituel) ou exogènes (génome viral), afin d'éviter l'induction d'une tolérance immunitaire périphérique PD-1 dépendante, c'est-à-dire dans ce cas précis l'absence de réponse à une entité pourtant étrangère. Cette immunotolérance périphérique est strictement spécifique de l'antigène et récessive, de sorte que seules les lymphocytes T ayant effectivement reconnu des peptides sur des DC inactives, sont inactivées. Le critère discriminant pour induire une réponse immunitaire adaptative est donc la reconnaissance de motifs antigéniques différents de ceux avec lesquels les récepteurs du système inné réagissent de manière continue ou habituelle: l'immunogénicité trouve sa source, et son explication dans l'induction par l'antigène de signaux de stress et/ou pro-inflammatoires (et non plus dans l'exogénicité de celui-ci). Le rôle tolérogénique des DC n'est donc pas un événement occasionnel. C'est un rôle critique au quotidien qu'exerce les DC lors de leur trafic des tissus périphériques (ex. le foie) vers les LN en l'absence d'inflammation et l'un des rôles que l'on doit dorénavant considérer dans le cadre des maladies infectieuses chroniques du foie. Il est désormais apparent que le foie est un site autant de tolérance que d'activation de réponses $CD8^+$ primaires efficaces, et que des DC activées y sont critiques pour maintenir la qualité des réponses engagées. L'élucidation, dans des études futures, des mécanismes moléculaires qui sont à la base des effets tolérogéniques sur l'activation intrahépatique primaire des $CD8^+$ par les DC hépatiques contribuera nettement à notre compréhension des fonctions immunitaires que ces dernières déploient dans le foie infecté. Une compréhension de cet équilibre ténu est nécessaire afin de développer des interventions thérapeutiques contre le VHC et le VHB basées sur l'immunomodulation des DC hépatiques et celles recrutées aux sites d'infections.

6. Conclusion

En résumé, les données accumulées suggèrent que le VHC exerce des effets inhibiteurs profonds sur le fonctionnement des MDC infectées, freinant le

développement de l'immunité adaptative. Cette étude est la première à rapporter une interaction quantitativement importante entre le VHC et les DC du sang, interaction qui soutient activement un mécanisme d'évasion immunitaire qui n'interfère qu'avec les fonctions des cellules ciblées, celles-là même qui présenteront les antigènes du VHC aux lymphocytes, de sorte que le VHC peut échapper à la réponse immune dirigée contre ses propres antigènes, sans toutefois induire une immunosuppression généralisée à d'autres antigènes chez l'hôte infecté. En soi, ces observations se prêtent bien au modèle qui prévaut actuellement, à savoir que l'aide décroissante et inadéquate des CD4⁺ VHC-spécifiques est responsable de l'échec des CD8⁺ à contenir l'évolution des mutants d'échappement (595), à éviter la tolérance immunitaire vis-à-vis leur antigène (207, 625) et à contrôler l'infection. En effet, en conformité avec de récentes études dans des modèles murins et des primates non-humains (316, 472), nos résultats montrent que le développement d'une mémoire CD8⁺ VHC-spécifique fonctionnelle nécessite l'activation directe des DC via l'engagement de leur TLR par les PAMP de l'agent pathogène contre lequel ces cellules sont dirigées. Ainsi, nous ajoutons une perspective manquante au modèle en plaçant les DC comme intermédiaires critiques entre le VHC et la qualité des réponses des lymphocytes T. Dans ce contexte, les rôles précis joués par les TLR individuels, ou par la liste croissante de PRR non-TLR tel que RIG-I, dans l'induction de réponse mémoire protectrice de longue durée constituent un secteur qui doit continuer à être activement exploré. Pour développer un vaccin ou un traitement efficace, il est primordial de comprendre, à l'échelle moléculaire, les interactions entre le virus et son hôte, et les mécanismes d'évasion immunitaires qui en résultent. À l'évidence, il s'agit là de voies particulièrement intéressantes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques applicables aux infections chroniques. Le défi sera de comprendre le rôle joué par les diverses sous-populations de DC pour réguler l'équilibre entre immunité et persistance. Si les DC sont de véritables adjuvants naturels, leur manipulation à des fins thérapeutiques contre le VHC n'en est toutefois qu'à ses débuts.

Si la DC mature et fonctionnellement normale dans l'infection au VHC reste présente à bien des esprits, cette description est vouée à disparaître. Elle correspond à une

vision réductrice, qui ne prend en compte ni la diversité et le caractère dynamique des signaux susceptibles d'activer une DC, ni la capacité des TLR de faire la discrimination entre le soi et le non soi afin de donner la spécificité immunogénique requise pour que l'antigène présenté induise une réponse immunitaire adaptative qui ne sombre pas dans l'immunotolérance. La volonté de simplifier les techniques et la surinterprétation de données obtenues avec un dispositif expérimental commode, mais éloigné de la réalité, ont contribué à cette vision déformée. L'exploitation de données obtenues avec des systèmes physiologiques devrait permettre de corriger cette conception. Le retour de la physiologie, pour cette question, a signifié l'analyse de MDC primaires, dans l'environnement sanguin, certes complexe et difficile à manipuler, mais qui évite les simplifications abusives. La prochaine étape sera d'étudier les DC intrahépatiques. La cytométrie polychromatique a déjà commencé et continuera à être un des outils privilégiés de ce type d'exploration de la vie des DC dans l'infection au VHC.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abbas, A. K., and A. H. Sharpe.** 2005. Dendritic cells give and take away. *Nature Immunology* **6**:227-228.
2. **Ackerman, A. L., and P. Cresswell.** 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature Immunology* **5**:678-84.
3. **Agagué, S., L. Perrin-Cocon, P. André, and V. Lotteau.** 2007. Hepatitis C lipo-Viro-particle from chronically infected patients interferes with TLR4 signaling in dendritic cell. *PLoS ONE* **2**:e330.
4. **Agnello, V.** 1997. Hepatitis C virus infection and type II cryoglobulinemia: an immunological perspective. *Hepatology* **26**:1375-9.
5. **Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight, and Q. X. Zhang.** 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**:12766-71.
6. **Aizaki, H., K. J. Lee, V. M. Sung, H. Ishiko, and M. M. Lai.** 2004. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* **324**:450-61.
7. **Akazawa, D., T. Date, K. Morikawa, A. Murayama, M. Miyamoto, M. Kaga, H. Barth, T. F. Baumert, J. Dubuisson, and T. Wakita.** 2007. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* **81**:5036-5045.
8. **Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. **2**:675-80.
9. **Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
10. **Albert, M. L., M. Jegathesan, and R. B. Darnell.** 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nature Immunology* **2**:1010-1017.
11. **Alexander-Miller, M. A.** 2005. High-avidity CD8⁺ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunologic Research* **31**:13-24.
12. **Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-738.
13. **Almeida, J. R., D. A. Price, L. Papagno, Z. A. Arkoub, D. Sauce, E. Bornstein, T. E. Asher, A. Samri, A. Schnuriger, I. Theodorou, D. Costagliola, C. Rouzioux, H. Agut, A. G. Marcelin, D. Douek, B. Autran, and V. Appay.** 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8⁺ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *Journal of Experimental Medicine* **204**:2473-2485.
14. **Almeida, J. R., D. A. Price, L. Papagno, Z. A. Arkoub, D. Sauce, E. Bornstein, T. E. Asher, A. Samri, A. Schnuriger, I. Theodorou, D. Costagliola, C. Rouzioux, H. Agut, A. G. Marcelin, D. Douek, B. Autran, and V. Appay.** 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8⁺ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *Journal of Experimental Medicine* **204**:2473-2485.
15. **Alric, L., M. Fort, J. Izopet, J. P. Vinel, J. P. Charlet, J. Selves, J. Puel, J. P. Pascal, M. Duffaut, and M. Abbal.** 1997. Genes of the major

- histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **113**:1675-81.
16. **Alter, H. J., R. H. Purcell, J. W. Shih, J. C. Melpolder, M. Houghton, Q. L. Choo, and G. Kuo.** 1989. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New England Journal of Medicine* **321**:1494-1500.
 17. **Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis.** 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**:1395-1401.
 18. **Andrews, D. M., C. E. Andoniou, F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, and M. A. Degli-Esposti.** 2001. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nature Immunology* **2**:1077-84.
 19. **Anthony, D. D., N. L. Yonkers, A. B. Post, R. Asaad, F. P. Heinzl, M. M. Lederman, P. V. Lehmann, and H. Valdez.** 2004. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *The Journal of Immunology* **172**: 4907-16.
 20. **Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J. P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel.** 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine* **13**:1050-1059.
 21. **Appay, V., P. R. Dunbar, M. Callan, P. Klenerman, G. M. Gillespie, L. Papagno, G. S. Ogg, A. King, F. Lechner, C. A. Spina, S. Little, D. V. Havlir, D. D. Richman, N. Gruener, G. Pape, A. Waters, P. Easterbrook, M. Salio, V. Cerundolo, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones.** 2002. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine* **8**:379-385.
 22. **Arstila, T. P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky.** 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**:958-961.
 23. **Augello, A., R. Tasso, S. M. Negrini, A. Amateis, F. Indiveri, R. Cancedda, and G. Pennesi.** 2005. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology* **35**:1482-1490.
 24. **Averill, L., W. M. Lee, and N. J. Karandikar.** 2007. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection. *Clinical Immunology* **123**:40-9.
 25. **Bachmann, M. F., P. Wolint, K. Schwarz, P. Jäger, and A. Oxenius.** 2005. Functional properties and lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *Journal of Immunology* **175**:4686-4696.
 26. **Bachmann, M. F., P. Wolint, S. Walton, K. Schwarz, and A. Oxenius.** 2007. Differential role of IL-2R signaling for CD8⁺ T cell responses in acute and chronic viral infections. *European Journal of Immunology* **37**:1502-1512.

27. **Badovinac, V. P., K. A. Messingham, T. S. Griffith, and J. T. Harty.** 2006. TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of "helpless" memory CD8 T cells. *Journal of Immunology* **177**:999-1006.
28. **Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty.** 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nature Immunology* **3**:619-626.
29. **Bain, C., A. Fatmi, F. Zoulim, J. P. Zarski, C. Trepo, and G. Inchauspe.** 2001. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* **120**:512-524.
30. **Bain, C., P. Parroche, J. P. Lavergne, B. Duverger, C. Vieux, V. Dubois, F. Komurian-Pradel, C. Trepo, L. Gebuhrer, G. Paranhos-Baccala, F. Penin, and G. Inchauspe.** 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* **78**:10460-10469.
31. **Barber, D. L., E. J. Wherry, and R. Ahmed.** 2003. Rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. *Journal of Immunology* **171**:27-31.
32. **Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed.** 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**:682-687.
33. **Barnes, E., S. M. Ward, V. O. Kasprowicz, G. Dusheiko, P. Klenerman, and M. Lucas.** 2004. Ultra-sensitive class I tetramer analysis reveals previously undetectable populations of antiviral CD8+ T cells. *European Journal of Immunology* **34**:1570-1577.
34. **Bartosch, B., J. Dubuisson, and F. L. Cosset.** 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine* **197**:633-642.
35. **Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F. L. Cosset.** 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry* **278**:41624-41630.
36. **Bassett, S. E., B. Guerra, K. Brasky, E. Miskovsky, M. Houghton, G. R. Klimpel, and R. E. Lanford.** 2001. Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology* **33**:1479-1487.
37. **Beales, L. P., A. Holzenburg, and D. J. Rowlands.** 2003. Viral internal ribosome entry site structures segregate into two distinct morphologies. *Journal of Virology* **77**:6574-6579.
38. **Becker, Y.** 2002. Herpes simplex virus evolved to use the human defense mechanisms to establish a lifelong infection in neurons -a review and hypothesis. *Virus Genes* **24**:187-196.
39. **Behrens, S. E., L. Tomei, and R. De Francesco.** 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO Journal* **15**:12-22.
40. **Beiske, K., R. Langholm, T. Godal, and P. F. Marton.** 1986. T-zone lymphoma with predominance of plasmacytoid T-cells associated with myelomonocytic leukaemia - a distinct clinicopathological entity. *Journal of Pathology* **150**:247-255.

41. **Bensch, B., H. C. Spangenberg, N. Kersting, C. Neumann-Haefelin, E. Panther, F. von Weizsäcker, H. E. Blum, H. Pircher, and R. Thimme.** 2007. 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. *Journal of Virology* **81**:945-953.
42. **Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller, and W. R. Heath.** 1997. Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *Journal of Experimental Medicine* **186**:65-70.
43. **Bertolino, P., D. G. Bowen, G. W. McCaughan, and B. Fazekas de St Groth.** 2001. Antigen-specific primary activation of CD8⁺ T cells within the liver. *Journal of Immunology* **166**:5430-5438.
44. **Bertolino, P., M. C. Trescol-Biemont, and C. Roubardin-Combe.** 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8⁺ T lymphocytes but fail to promote survival. *European Journal of Immunology* **28**:21-236.
45. **Bertolino, P., M. C. Trescol-Biemont, J. Thomas, B. Fazekas de St Groth, M. Pihlgren, J. Marvel, and C. Roubardin-Combe.** 1999. Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *International Immunology* **11**:1225-1238.
46. **Betts, M. R., M. C. Nason, S. M. West, S. C. De Rosa, S. A. Migueles, J. Abraham, M. M. Lederman, J. M. Benito, P. A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer, and R. A. Koup.** 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* **107**:4781-4789.
47. **Beuneu, H., Z. Garcia, and P. Bouso.** 2006. Cognate CD4 help promotes recruitment of antigen-specific CD8 T cells around dendritic cells. *Journal of Immunology* **177**:1406-1410.
48. **Bevan, M. J.** 2004. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature Review Immunology* **4**:595-602.
49. **Bezuga, Y., A. Kolada, S. Kamionka, B. Bernard, R. Scheibe, and P. Dieter.** 2006. COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE2 and TxA2 in liver macrophages. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **79**:93-100.
50. **Binder, M., G. Kochs, R. Bartenschlager, and V. Lohmann.** 2007. Hepatitis C virus escape from the interferon regulatory factor 3 pathway by a passive and active evasion strategy. *Hepatology* **46**:1365-1374.
51. **Bizollon, T., S. N. Ahmed, S. Radenne, M. Chevallier, P. Chevallier, P. Parvaz, S. Guichard, C. Ducerf, J. Baulieux, F. Zoulim, and C. Trepo.** 2003. Long term histological improvement and clearance of intrahepatic hepatitis C virus RNA following sustained response to interferon-ribavirin combination therapy in liver transplanted patients with hepatitis C virus recurrence. *Gut* **52**:283-287.
52. **Blachère, N. E., H. K. Morris, D. Braun, H. Saklani, J. P. Di Santo, R. B. Darnell, and M. L. Albert.** 2006. IL-2 is required for the activation of memory CD8⁺ T cells via antigen cross-presentation. *Journal of Immunology* **176**:7288-7300.

53. **Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouillé.** 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* **80**:6964-6972.
54. **Blattman, J. N., R. Antia, D. J. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman, and R. Ahmed.** 2002. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *Journal of Experimental Medicine* **195**:657-664.
55. **Blindenbacher, A., F. H. Duong, L. Hunziker, S. T. Stutvoet, X. Wang, L. Terracciano, D. Moradpour, H. E. Blum, T. Alonzi, M. Tripodi, N. La Monica, and M. H. Heim.** 2003. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology* **124**:1465-1475.
56. **Boisvert, J., X. S. He, R. Cheung, E. B. Keefe, T. Wright, and H. B. Greenberg.** 2001. Quantitative analysis of hepatitis C virus in peripheral blood and liver: replication detected only in liver. *Journal of Infectious Disease* **184**:827-835.
57. **Boni, C., P. Fiscaro, C. Valdatta, B. Amadei, P. Di Vincenzo, T. Giuberti, D. Laccabue, A. Zerbini, A. Cavalli, G. Missale, A. Bertolotti, and C. Ferrari.** 2007. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *Journal of Virology* **81**:4215-4225.
58. **Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y. J. Liu, and A. O'Garra.** 2003. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *Journal of Experimental Medicine* **197**:101-109.
59. **Botarelli, P., M. R. Brunetto, M. A. Minutello, P. Calvo, D. Unutmaz, A. J. Weiner, Q. L. Choo, J. R. Shuster, G. Kuo, and F. Bonino.** 1993. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* **104**:580-587.
60. **Bouffard, P., P. H. Hayashi, R. Acevedo, N. Levy, and J. B. Zeldis.** 1992. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *Journal of Infectious Disease* **166**:1276-1280.
61. **Bourgeois, C., H. Veiga-Fernandes, A. M. Joret, B. Rocha, and C. Tanchot.** 2002. CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *European Journal of Immunology* **32**:2199-2207.
62. **Bouso, P., and E. Robey.** 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nature Immunology* **4**:579-585.
63. **Bowen, D. G., G. W. McCaughan, and P. Bertolino.** 2005. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends in Immunology* **26**:512-517.
64. **Bowen, D. G., and C. M. Walker.** 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* **436**:946-952.
65. **Bowen, D. G., M. Zen, L. Holz, T. Davis, G. W. McCaughan, and P. Bertolino.** 2004. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *Journal of Clinical Investigation* **114**:701-712.

66. **Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek.** 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine* **12**:1365-1371.
67. **Brooks, D. G., D. B. McGavern, and M. B. Oldstone.** 2006. Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *Journal of Clinical Investigation* **116**:1675-1685.
68. **Brooks, D. G., M. J. Trifilo, K. H. Edelmann, L. Teyton, D. B. McGavern, and M. B. Oldstone.** 2006. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature Medicine* **12**:1301-1309.
69. **Brown, G. R., E. L. Lee, and D. L. Thiele.** 2003. TNF enhances CD4+ T cell alloproliferation, IFN-gamma responses, and intestinal graft-versus-host disease by IL-12-independent mechanisms. *Journal of Immunology* **170**:5082-5088.
70. **Brown, J. A., D. M. Dorfman, F. R. Ma, E. L. Sullivan, O. Munoz, C. R. Wood, E. A. Greenfield, and G. J. Freeman.** 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *Journal of Immunology* **170**:1257-1266.
71. **Buechler, C., M. Ritter, C. D. Quoc, A. Agildere, and G. Schmitz.** 1999. Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* **262**:251-254.
72. **Bukh, J., R. H. Miller, and R. H. Purcell.** 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars of Liver Disease* **15**:41-63.
73. **Bullock, T. N., and H. Yagita.** 2005. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *Journal of Immunology* **174**:710-717.
74. **Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman.** 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**:111-122.
75. **Cabot, B., J. I. Esteban, M. Martell, J. Genesca, V. Vargas, R. Esteban, J. Guardia, and J. Gomez.** 1997. Structure of replicating hepatitis C virus (HCV) quasispecies in the liver may not be reflected by analysis of circulating HCV virions. *Journal of Virology* **71**:1732-1734.
76. **Castellino, F., and R. N. Germain.** 2007. Chemokine-guided CD4+ T cell help enhances generation of IL-6RalphahighIL-7Ralpha high prememory CD8+ T cells. *Journal of Immunology* **178**:778-787.
77. **Castellino, F., A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, and R. N. Germain.** 2006. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**:890-895.

78. **Castillo, I., E. Rodríguez-Iñigo, J. M. López-Alcorocho, M. Pardo, J. Bartolomé, and V. Carreño.** 2006. Hepatitis C virus replicates in the liver of patients who have a sustained response to antiviral treatment. *Clinical Infectious Disease* **43**:1277-1283.
79. **Catanese, M. T., R. Graziani, T. von Hahn, M. Moreau, T. Huby, G. Paonessa, C. Santini, A. Luzzago, C. M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli, and A. Nicosia.** 2007. High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *Journal of Virology* **81**:8063-8071.
80. **Caux, C., S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. de Bouteiller, M. C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik, and A. Vicari.** 2000. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Seminar of Immunopathology* **22**:345-369.
81. **Celli, S., Z. Garcia, and P. Bousso.** 2005. CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **202**:1271-1278.
82. **Celli, S., F. Lemaître, and P. Bousso.** 2007. Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation. *Immunity* **27(4)**:625-634.
83. **Cerwenka, A., T. M. Morgan, and R. W. Dutton.** 1999. Naive, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial. *Journal of Immunology* **163**:5535-5543.
84. **Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler, and C. M. Rice.** 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology* **44**:649-688.
85. **Champagne, P., G. S. Ogg, A. S. King, C. Knabenhans, K. Ellefsen, M. Nobile, V. Appay, G. P. Rizzardì, S. Fleury, M. Lipp, R. Förster, S. Rowland-Jones, R. P. Sékaly, A. J. McMichael, and G. Pantaleo.** 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**:106-111.
86. **Chang, J., J. H. Cho, S. W. Lee, S. Y. Choi, S. J. Ha, and Y. C. Sung.** 2004. IL-12 priming during in vitro antigenic stimulation changes properties of CD8 T cells and increases generation of effector and memory cells. *Journal of Immunology* **172**:2818-2826.
87. **Chang, J. T., V. R. Palanivel, I. Kinjyo, F. Schambach, A. M. Intlekofer, A. Banerjee, S. A. Longworth, K. E. Vinup, P. Mrass, J. Oliaro, N. Killeen, J. S. Orange, S. M. Russell, W. Weninger, and S. L. Reiner.** 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**:1687-1691.
88. **Chang, K. M., R. Thimme, J. J. Melpolder, D. Oldach, J. Pemberton, J. Moorhead-Loudis, J. G. McHutchison, H. J. Alter, and F. V. Chisari.** 2001. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* **33**:267-276.
89. **Chemnitz, J. M., R. V. Parry, K. E. Nichols, C. H. June, and J. L. Riley.** 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based

- switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *Journal of Immunology* **173**:945-954.
90. **Chen, L.** 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Review Immunology* **4**:336-347.
 91. **Cheng, F., H. W. Wang, A. Cuenca, M. Huang, T. Ghansah, J. Brayer, W. G. Kerr, K. Takeda, S. Akira, S. P. Schoenberger, H. Yu, R. Jove, and E. M. Sotomayor.** 2003. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* **19**:425-436.
 92. **Cheng, G., J. Zhong, and F. V. Chisari.** 2006. Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**:8499-84504.
 93. **Choe, J., M. S. Kelker, and I. A. Wilson.** 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309(5734)**:581-585.
 94. **Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton.** 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**:359-362.
 95. **Chow, A., D. Toomre, W. Garrett, and I. Mellman.** 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* **418**:988-994.
 96. **Cleary, A. M., W. Tu, A. Enright, T. Giffon, R. Dewaal-Malefyt, K. Gutierrez, and D. B. Lewis.** 2003. Impaired accumulation and function of memory CD4 T cells in human IL-12 receptor beta 1 deficiency. *Journal of Immunology* **170**:597-603.
 97. **Colonna, M., G. Trinchieri, and Y. J. Liu.** 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology* **5**:1219-1226.
 98. **Cooper, S., A. L. Erickson, E. J. Adams, J. Kansopon, A. J. Weiner, D. Y. Chien, M. Houghton, P. Parham, and C. M. Walker.** 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* **10**:439-449.
 99. **Covert, M. W., T. H. Leung, J. E. Gaston, and D. Baltimore.** 2005. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* **309**:1854-1857.
 100. **Cramp, M. E., P. Carucci, J. Underhill, N. Naoumov, R. Williams, and P. T. Donaldson.** 1998. Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. *Journal of Hepatology* **29**:207-213.
 101. **Cramp, M. E., S. Rossol, S. Chokshi, P. Carucci, R. Williams, and N. V. Naoumov.** 2000. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **118**:346-355.
 102. **Crawford, A., and E. J. Wherry.** 2007. Inhibitory receptors: whose side are they on? *Nature Immunology* **8**:1201-1203.
 103. **Cribier, B., C. Schmitt, A. Kirn, and F. Stoll-Keller.** 1998. Inhibition of hepatitis C virus adsorption to peripheral blood mononuclear cells by dextran sulfate. *Archives of Virology* **143**:375-379.
 104. **Crispe, I. N.** 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nature Review Immunology* **3**:51-62.

105. **Crispe, I. N., M. Giannandrea, K. I., B. John, B. Sampson, and S. Wuensch.** 2006. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunological Reviews* **213**:101-118.
106. **Cucchiaroni, M., A. R. Kammer, B. Grabscheid, H. M. Diepolder, T. J. Gerlach, N. Gruner, T. Santantonio, J. Reichen, G. R. Pape, and A. Cerny.** 2000. Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cellular Immunology* **203**:111-123.
107. **Curtsinger, J. M., M. Y. Gerner, D. C. Lins, and M. F. Mescher.** 2007. Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. *Journal of Immunology* **178**:6752-6760.
108. **Curtsinger, J. M., C. M. Johnson, and M. F. Mescher.** 2003. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *Journal of Immunology* **171**:5165-5171.
109. **Curtsinger, J. M., D. C. Lins, C. M. Johnson, and M. F. Mescher.** 2005. Signal 3 tolerant CD8 T cells degranulate in response to antigen but lack granzyme B to mediate cytotoxicity. *Journal of Immunology* **174**:600-4.
110. **Curtsinger, J. M., D. C. Lins, and M. F. Mescher.** 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *Journal of Experimental Medicine* **197**:1141-1151.
111. **Curtsinger, J. M., J. O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins, and M. F. Mescher.** 2005. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *Journal of Immunology* **174**:4465-4469.
112. **Cusson-Hermance, N., S. Khurana, T. H. Lee, K. A. Fitzgerald, and M. A. Kelliher.** 2005. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *Journal of Biological Chemistry* **280**:36560-36566.
113. **D'Amico, G., G. Frascaroli, G. Bianchi, P. Transidico, A. Doni, A. Vecchi, S. Sozzani, P. Allavena, and A. Mantovani.** 2000. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nature Immunology* **1**:387-91.
114. **Darrah, P. A., D. T. Patel, P. M. De Luca, R. W. Lindsay, D. F. Davey, B. J. Flynn, S. T. Hoff, P. Andersen, S. G. Reed, S. L. Morris, M. Roederer, and R. A. Seder.** 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature Medicine* **13**:843-850.
115. **Datta, S. K., V. Redecke, K. R. Prilliman, K. Takabayashi, M. Corr, T. Tallant, J. DiDonato, R. Dziarski, S. Akira, S. P. Schoenberger, and E. Raz.** 2003. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *Journal of Immunology* **170**:4102-4110.
116. **Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B.**

- D. Walker.** 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**:350-354.
117. **Day, C. L., G. M. Lauer, G. K. Robbins, B. McGovern, A. G. Wurcel, R. T. Gandhi, R. T. Chung, and B. D. Walker.** 2002. Broad specificity of virus-specific CD4⁺ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* **76**:12584-95.
118. **Day, C. L., N. P. Seth, M. Lucas, H. Appel, L. Gauthier, G. M. Lauer, G. K. Robbins, Z. M. Szczepiorkowski, D. R. Casson, R. T. Chung, S. Bell, G. Harcourt, B. D. Walker, P. Klenerman, and K. W. Wucherpfennig.** 2003. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *Journal of Clinical Investigation* **112**:831-42.
119. **De Francesco, R., A. Pessi, and C. Steinkühler.** 1998. The hepatitis C virus NS3 proteinase: structure and function of a zinc-containing serine proteinase. *Antiviral Therapy* **3**:99-109.
120. **De Vos, R., C. Verslype, E. Depla, J. Fevery, B. Van Damme, V. Desmet, and T. Roskams.** 2002. Ultrastructural visualization of hepatitis C virus components in human and primate liver biopsies. *Journal of Hepatology* **37**:370-9.
121. **Del Hoyo, G. M., P. Martin, H. H. Vargas, S. Ruiz, C. F. Arias, and C. Ardavin.** 2002. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* **415**:1043-7.
122. **Della Bella, S., A. Crosignani, A. Riva, P. Presicce, A. Benetti, R. Longhi, M. Podda, and M. L. Villa.** 2007. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4⁺ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology* **121**:283-92.
123. **Delon, J., S. Stoll, and R. N. Germain.** 2002. Imaging of T-cell interactions with antigen presenting cells in culture and in intact lymphoid tissue. *Immunology Review* **189**:51-63.
124. **Dempsey, P. W., M. E. Allison, S. Akkaraju, C. C. Goodnow, and D. T. Fearon.** 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant : bridging innate and acquired immunity. *Science* **271**:348-350.
125. **Dempsey, P. W., M. E. Allison, S. Akkaraju, C. C. Goodnow, and D. T. Fearon.** 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* **271**:348-50.
126. **Derby, M., M. Alexander-Miller, and R. v. Tse, J.** 2001. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *Journal of Immunology* **166**:1690-1697.
127. **Dhodapkar, M. V., and R. M. Steinman.** 2002. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* **100**:174-177.
128. **Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, and N. Bhardwaj.** 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **193**:233-238.

129. **Di Bisceglie, A. M.** 2000. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology* **31**:1014-8.
130. **Di Marco, S., M. Rizzi, C. Volpari, M. A. Walsh, F. Narjes, S. Colarusso, R. De Francesco, V. G. Matassa, and M. Sollazzo.** 2000. Inhibition of the hepatitis C virus NS3/4A protease. The crystal structures of two protease-inhibitor complexes. *Journal of Biological Chemistry* **275**:7152-717.
131. **Diebold, S. S., M. Montoya, H. Unger, L. Alexopoulou, P. Roy, L. E. Haswell, A. Alshamkhani, R. A. Flavell, P. Borrow, and C. Reis E Sousa.** 2003. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* **424**:324-328.
132. **Diehl, L., A. Schurich, R. Grochtmann, S. Hegenbarth, L. Chen, and P. A. Knolle.** 2007. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8(+) T cell tolerance. *Hepatology* **47**:296-305.
133. **Diepolder, H. M., J. T. Gerlach, R. Zachoval, R. M. Hoffmann, M. C. Jung, E. A. Wierenga, S. Scholz, T. Santantonio, M. Houghton, S. Southwood, A. Sette, and G. R. Pape.** 1997. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* **71**:6011-9.
134. **Diepolder, H. M., R. Zachoval, R. M. Hoffmann, E. A. Wierenga, T. Santantonio, M. C. Jung, D. Eichenlaub, and G. R. Pape.** 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* **346**:1006-7.
135. **Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux.** 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine* **188**:396-86.
136. **Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen.** 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine* **5**:1365-1369.
137. **Drummer, H. E., K. A. Wilson, and P. Pombourios.** 2002. Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *Journal of Virology* **76**:11143-11147.
138. **Dubuisson, J.** 2000. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **242**:135-48.
139. **Dubuisson, J., H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell, and C. M. Rice.** 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology* **68**:6147-60.
140. **Dubuisson, J., F. Penin, and D. Moradpour.** 2002. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends in Cellular Biology* **12**:517-23.
141. **Ducoulombier, D., A. M. Roque-Afonso, G. Di Liberto, F. Penin, R. Kara, Y. Richard, E. Dussaix, and C. Feray.** 2004. Frequent compartmentalization

- of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* **39**:817-25.
142. **Dustin, L. B., and C. M. Rice.** 2007. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annual Review of Immunology* **25**:71-99.
 143. **Duvall, M. G., M. L. Precopio, D. A. Ambrozak, A. Jaye, A. J. McMichael, H. C. Whittle, M. Roederer, S. L. Rowland-Jones, and R. A. Koup.** 2008. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *European Journal of Immunology* **38**:350-3563.
 144. **Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck, and J. Schmitz.** 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology* **165**:6037-46.
 145. **Dzionek, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi, and J. Schmitz.** 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Human Immunology* **63**:1133-48.
 146. **Dzionek, A., Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Gunther, I. Johnston, A. Lanzavecchia, T. Nagasaka, T. Okada, W. Vermi, G. Winkels, T. Yamamoto, M. Zysk, Y. Yamaguchi, and J. Schmitz.** 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *Journal of Experimental Medicine* **194**:1823-34.
 147. **Eckels, D. D., H. Wang, T. H. Bian, N. Tabatabai, and J. C. Gill.** 2000. Immunobiology of hepatitis C virus (HCV) infection: the role of CD4 T cells in HCV infection. *Immunology Review* **174**:90-7.
 148. **Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz.** 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology* **76**:5974-84.
 149. **Eisen-Vandervelde, A. L., Z. Q. Yao, and Y. S. Hahn.** 2004. The molecular basis of HCV-mediated immune dysregulation. *Clinical Immunology* **111**:16-21.
 150. **Elazar, M., P. Liu, C. M. Rice, and J. S. Glenn.** 2004. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *Journal of Virology* **78**:11393-400.
 151. **Engering, A., and J. Pieters.** 2001. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *International Immunology* **13**:127-34.
 152. **Erickson, A. L., M. Houghton, Q. L. Choo, A. J. Weiner, R. Ralston, E. Muchmore, and C. M. Walker.** 1993. Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *Journal of Immunology* **151**:4189-99.
 153. **Erickson, A. L., Y. Kimura, S. Igarashi, J. Eichelberger, M. Houghton, J. Sidney, D. McKinney, A. Sette, A. L. Hughes, and C. M. Walker.** 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **15**:883-95.

154. **Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wölk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz, and C. M. Rice.** 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**:801-805.
155. **Failla, C., L. Tomei, and R. De Francesco.** 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of Virology* **68**:3753-3760.
156. **Fanning, L. J., E. Kenny-Walsh, and F. Shanahan.** 2004. Persistence of hepatitis C virus in a white population: associations with human leukocyte antigen class 1. *Human Immunology* **65**:745-51.
157. **Farci, P., H. J. Alter, S. Govindarajan, D. C. Wong, R. Engle, R. R. Lesniewski, I. K. Mushahwar, S. M. Desai, R. H. Miller, and N. Ogata.** 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* **258**:135-40.
158. **Farci, P., H. J. Alter, D. C. Wong, R. H. Miller, S. Govindarajan, R. Engle, M. Shapiro, and R. H. Purcell.** 1994. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**:7792-6.
159. **Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. De Gioannis, A. Strazzer, Y. Shimizu, M. Shapiro, H. J. Alter, and R. H. Purcell.** 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**:15394-9.
160. **Fearon, D. T., and R. H. Carter.** 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annual Review of Immunology* **13**:127-49.
161. **Fearon, D. T., and R. M. Locksley.** 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**:50-53.
162. **Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, and R. H. Purcell.** 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* **182**:1026-1028.
163. **Ferrari, C., A. Valli, L. Galati, A. Penna, P. Scaccaglia, T. Giuberti, C. Schianchi, G. Missale, M. G. Marin, and F. Fiaccadori.** 1994. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology* **19**:286-95.
164. **Ferreon, J. C., A. C. Ferreon, K. Li, and S. M. Lemon.** 2005. Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *Journal of Biological Chemistry*.
165. **Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock.** 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *Journal of Experimental Medicine* **198(7)**:1043-55:1043-1055.
166. **Flint, M., E. R. Quinn, and S. Levy.** 2001. In search of hepatitis C virus receptor(s). *Clinical Liver Disease* **5**:873-93.
167. **Flint, M., T. von Hahn, J. Zhang, M. Farquhar, C. T. Jones, P. Balfe, C. M. Rice, and J. A. McKeating.** 2006. Diverse CD81 proteins support

- hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* **80(22):11331-42:11331-11342**.
168. **Foy, E., K. Li, R. Sumpter, Y. M. Loo, C. L. Johnson, C. Wang, P. M. Fish, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon, and M. Gale.** 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102:2986-2991**.
 169. **Foy, E., K. Li, C. Wang, R. Sumpter, M. Ikeda, S. M. Lemon, and M. Gale.** 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* **300:1145-8**.
 170. **Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo.** 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine* **192:1027-1034**.
 171. **Freeman, G. J., E. J. Wherry, R. Ahmed, and A. H. Sharpe.** 2006. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *Journal of Experimental Medicine* **203:2223-2227**.
 172. **Frese, M., V. Schwarzle, K. Barth, N. Krieger, V. Lohmann, S. Mihm, O. Haller, and R. Bartenschlager.** 2002. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* **35:694-703**.
 173. **Friebe, P., J. Boudet, J. P. Simorre, and R. Bartenschlager.** 2005. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of Virology* **79:380-392**.
 174. **Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A. J. Bonito, and R. M. Steinman.** 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *Journal of Experimental Medicine* **199:1607-1618**.
 175. **Fukao, T., and S. Koyasu.** 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends in Immunology* **24:358-363**.
 176. **Fuller, M. J., D. A. Hildeman, S. Sabbaj, D. E. Gaddis, A. E. Tebo, L. Shang, P. A. Goepfert, and A. J. Zajac.** 2005. Emergence of CD127high functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. *Journal of Immunology* **174:5926-5930**.
 177. **Fuller, M. J., and A. J. Zajac.** 2003. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *Journal of Immunology* **170:477-86**.
 178. **Gale, M., and E. M. Foy.** 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* **436:939-945**.
 179. **Gallimore, A., A. Glithero, A. Godkin, A. C. Tissot, A. Pluckthun, T. Elliott, H. Hengartner, and R. Zinkernagel.** 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *Journal of Experimental Medicine* **187:1383-93**.
 180. **Gao, L., H. Aizaki, J. W. He, and M. M. Lai.** 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation

- of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology* **78**:3480-8.
181. **Gautier, G., M. Humbert, F. Deauvieu, M. Sculler, J. Hiscott, E. E. Bates, G. Trinchieri, C. Caux, and P. Garrone.** 2005. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*.
 182. **Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia.** 2001. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *Journal of Experimental Medicine* **194**:1711-1719.
 183. **Geissmann, F., S. Jung, and D. R. Littman.** 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**:71-82.
 184. **Gerlach, J. T., H. M. Diepolder, M. C. Jung, N. H. Gruener, W. W. Schraut, R. Zachoval, R. Hoffmann, C. A. Schirren, T. Santantonio, and G. R. Pape.** 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* **117**:933-41.
 185. **Gerlach, J. T., H. M. Diepolder, R. Zachoval, N. H. Gruener, M. C. Jung, A. Ulsenheimer, W. W. Schraut, C. A. Schirren, M. Waechter, M. Backmund, and G. R. Pape.** 2003. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* **125**:80-8.
 186. **Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubeau, X. M. Dai, E. R. Stanley, G. J. Randolph, and M. Merad.** 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature Immunology* **7**:265-273.
 187. **Godkin, A.** 2002. Evolution of epitope-specific memory CD4(+) T cells after clearance of hepatitis C virus. *Journal of Immunology* **169**:2210-2214.
 188. **Godkin, A., N. Jeanguet, M. Thursz, P. Openshaw, and H. Thomas.** 2001. Characterization of novel HLA-DR11-restricted HCV epitopes reveals both qualitative and quantitative differences in HCV-specific CD4+ T cell responses in chronically infected and non-viremic patients. *European Journal of Immunology* **31**:1438-46.
 189. **Goffard, A., and J. Dubuisson.** 2003. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* **85**:295-301.
 190. **Goldberg, M. V., C. H. Maris, E. L. Hipkiss, A. S. Flies, L. Zhen, R. M. Tuder, J. F. Grosso, T. J. Harris, D. Getnet, K. A. Whartenby, D. G. Brockstedt, T. W. Dubensky, L. Chen, D. M. Pardoll, and C. G. Drake.** 2007. Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood* **110**:186-192.
 191. **Golden-Mason, L., J. R. Burton, N. Castelblanco, J. Klarquist, S. Benlloch, C. Wang, and H. R. Rosen.** 2006. Loss of IL-7 receptor alpha-chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence. *Hepatology* **44**:1098-1109.
 192. **Golden-Mason, L., B. Palmer, J. Klarquist, J. A. Mengshol, N. Castelblanco, and H. R. Rosen.** 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *Journal of Virology* **81**:9249-9258.

193. **Goriely, S., C. Molle, M. Nguyen, V. Albarani, N. O. Haddou, R. Lin, D. De Wit, V. Flamand, F. Willems, and M. Goldman.** 2006. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *107*:1078-1084.
194. **Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour.** 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of Virology* *77*:5487-92.
195. **Goutagny, N., A. Fatmi, V. De Ledinghen, F. Penin, P. Couzigou, G. Inchauspe, and C. Bain.** 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Disease* *187*:1951-8.
196. **Gowans, E. J., K. L. Jones, M. Bharadwaj, and D. C. Jackson.** 2004. Prospects for dendritic cell vaccination in persistent infection with hepatitis C virus. *Journal of Clinical Virology* *30*:283-90.
197. **Gowen, B. B., M. H. Wong, K. H. Jung, A. B. Sanders, W. M. Mitchell, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and R. W. Sidwell.** 2007. TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. *Journal of Immunology* *178*:5200-5208.
198. **Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice.** 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* *90*:10583-7.
199. **Grakoui, A., N. H. Shoukry, D. J. Woollard, J. H. Han, H. L. Hanson, J. Ghayeb, K. K. Murthy, C. M. Rice, and C. M. Walker.** 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* *302*:659-62.
200. **Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone, and C. M. Rice.** 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of Virology* *67*:1385-95.
201. **Granucci, F., C. Vizzardelli, N. Pavelka, S. Feau, M. Persico, E. Virzi, M. Rescigno, G. Moro, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nature Immunology* *2*:882-8.
202. **Granucci, F., I. Zanoni, S. Feau, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2003. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO Journal* *22*:2546-51.
203. **Granucci, F., I. Zanoni, N. Pavelka, S. L. Van Dommelen, C. E. Andoniou, F. Belardelli, M. A. Degli Esposti, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2004. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *Journal of Experimental Medicine* *200*:287-95.
204. **Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe.** 2005. The B7 family revisited. *Annual Review Immunology* *23*:515-548.
205. **Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, and Y. J. Liu.** 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic

- cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *Journal of Experimental Medicine* **185**:1101-11.
206. **Gruener, 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. *Journal of Infectious Disease* **181**:1528-36.
207. **Gruener, N. H., F. Lechner, M. C. Jung, H. Diepolder, T. Gerlach, G. Lauer, B. Walker, J. Sullivan, R. Phillips, G. R. Pape, and P. Klenerman.** 2001. Sustained dysfunction of antiviral CD8⁺ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *Journal of Virology* **75**:5550-8.
208. **Guermontprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert, and S. Amigorena.** 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**:397-402.
209. **Guermontprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena.** 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **20**:621-67.
210. **Guidotti, L. G., T. Ishikawa, M. V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber, and F. V. Chisari.** 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **4**:25-36.
211. **Häcker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L. C. Hsu, G. G. Wang, M. P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Häcker, M. Mann, and M. Karin.** 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**:204-207.
212. **Halary, F., A. Amara, H. Lortat-Jacob, M. Messerle, T. Delaunay, C. Houles, F. Fieschi, F. Arenzana-Seisdedos, J. Moreau, and J. Dechanet-Merville.** 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* **17**:653-64.
213. **Hamilton, S. E., M. C. Wolkers, S. P. Schoenberger, and S. C. Jameson.** 2006. The generation of protective memory-like CD8⁺ T cells during homeostatic proliferation requires CD4⁺ T cells. *Nature Immunology* **7**:475-481.
214. **Hammarlund, E., M. W. Lewis, S. G. Hansen, L. I. Strelow, J. A. Nelson, G. J. Sexton, J. M. Hanifin, and M. K. Slifka.** 2003. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature Medicine* **9**:1131-1137.
215. **Han, J. Q., and D. J. Barton.** 2002. Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA* **8**:512-525.
216. **Han, J. Q., G. Wroblewski, Z. Xu, R. H. Silverman, and D. J. Barton.** 2004. Sensitivity of hepatitis C virus RNA to the antiviral enzyme ribonuclease L is determined by a subset of efficient cleavage sites. *Journal of Interferon Cytokine Research* **24**:664-676.
217. **Hand, T. W., M. Morre, and S. M. Kaech.** 2007. Expression of IL-7 receptor alpha is necessary but not sufficient for the formation of memory CD8 T cells during viral infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**:11730-11735.

218. **Harari, A., C. Cellera, F. B. Enders, J. Köstler, L. Codarri, G. Tapia, O. Boyman, E. Castro, S. Gaudieri, I. James, M. John, R. Wagner, S. Mallal, and G. Pantaleo.** 2007. Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**:16233-16238.
219. **Harcourt, G., S. Hellier, M. Bunce, J. Satsangi, J. Collier, R. Chapman, R. Phillips, and P. Klenerman.** 2001. Effect of HLA class II genotype on T helper lymphocyte responses and viral control in hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatology* **8**:174-9.
220. **Harizi, H., M. Juzan, V. Pitard, J. F. Moreau, and N. Gualde.** 2002. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *Journal of Immunology* **168**:2255-2263.
221. **Harty, J. T., A. R. Tvinnereim, and D. W. White.** 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual Review of Immunology* **18**:275-308.
222. **He, X. S., B. Rehermann, F. X. Lopez-Labrador, J. Boisvert, R. Cheung, J. Mumm, H. Wedemeyer, M. Berenguer, T. L. Wright, M. M. Davis, and H. B. Greenberg.** 1999. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**:5692-7.
223. **Hemmi, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kaisho, H. Sanjo, T. Kawai, K. Hoshino, K. Takeda, and S. Akira.** 2004. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *Journal of Experimental Medicine* **199**:1641-1650.
224. **Hernández, M. G., L. Shen, and K. L. Rock.** 2007. CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8+ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4+ T cell help. *Journal of Immunology* **178**:2844-2852.
225. **Hertel, L., V. G. Lacaille, H. Strobl, E. D. Mellins, and E. S. Mocarski.** 2003. Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *Journal of Virology* **77**:7563-74.
226. **Hervas-Stubbs, S., A. Olivier, F. Boisgerault, N. Thieblemont, and C. Leclerc.** 2007. TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8+ T cells in the absence of CD4+ T-cell help. *Blood* **109**:5318-5326.
227. **Heydtmann, M., D. Hardie, P. L. Shields, J. Faint, C. D. Buckley, J. J. Campbell, M. Salmon, and D. H. Adams.** 2006. Detailed analysis of intrahepatic CD8 T cells in the normal and hepatitis C-infected liver reveals differences in specific populations of memory cells with distinct homing phenotypes. *Journal of Immunology* **177**:729-738.
228. **Hiroishi, K., H. Kita, M. Kojima, H. Okamoto, T. Moriyama, T. Kaneko, T. Ishikawa, S. Ohnishi, T. Aikawa, N. Tanaka, Y. Yazaki, K. Mitamura, and M. Imawari.** 1997. Cytotoxic T lymphocyte response and viral load in hepatitis C virus infection. *Hepatology* **25**:705-12.

229. **Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner.** 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**:11416-21.
230. **Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabet, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler.** 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**:743-8.
231. **Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler.** 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* **5**:971-974.
232. **Hoebe, K., E. M. Janssen, S. O. Kim, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, J. Han, and B. Beutler.** 2003. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nature Immunology* **4**:1223-1229.
233. **Hoffmann, R. M., H. M. Diepolder, R. Zachoval, F. M. Zwiebel, M. C. Jung, S. Scholz, H. Nitschko, G. Riethmuller, and G. R. Pape.** 1995. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* **21**:632-8.
234. **Honda, K., Y. Ohba, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya, and T. Taniguchi.** 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **434**:1035-1040.
235. **Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, and T. Taniguchi.** 2003. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **100**:10872-7.
236. **Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi.** 2006. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**:349-360.
237. **Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi.** 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**:772-777.
238. **Hoofnagle, J. H.** 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* **36**:S21-9.
239. **Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzózka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann.** 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**:994-997.
240. **Horny, H. P., A. C. Feller, H. A. Horst, and K. Lennert.** 1987. Immunocytology of plasmacytoid T cells: marker analysis indicates a unique phenotype of this enigmatic cell. *Human Pathology* **18**:28-32.
241. **Hou, S., and P. C. Doherty.** 1993. Partitioning of responder CD8+ T cells in lymph node and lung of mice with Sendai virus pneumonia by LECAM-1 and CD45RB phenotype. *Journal of Immunology* **150**:5494-5500.

242. **Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M. F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks, and M. Desjardins.** 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**:402-6.
243. **Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice, and J. A. McKeating.** 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**:7271-6.
244. **Huster, K. M., V. Busch, M. Schiemann, K. Linkemann, K. M. Kerksiek, H. Wagner, and D. H. Busch.** 2004. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:5610-5615.
245. **Huster, K. M., M. Koffler, C. Stemberger, M. Schiemann, H. Wagner, and D. H. Busch.** 2006. Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells. *European Journal of Immunology* **36**:1453-1464.
246. **Igarashi, O., T. Yanagida, M. Azuma, K. Okumura, and H. Nariuchi.** 1996. B7-1 synergizes with interleukin-12 in interleukin-2 receptor alpha expression by mouse T helper 1 clones. *European Journal of Immunology* **26**:300-6.
247. **Inchauspe, G.** 2001. Role of neutralizing antibodies and cellular immunity in hepatitis C virus infection. *Transfusion clinique Biologie* **8**:471-4.
248. **Intlekofer, A. M., N. Takemoto, C. Kao, A. Banerjee, F. Schambach, J. K. Northrop, H. Shen, E. J. Wherry, and S. L. Reiner.** 2007. Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* **204**:2015-2021.
249. **Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A. P. Russ, T. Lindsten, J. S. Orange, A. W. Goldrath, R. Ahmed, and S. L. Reiner.** 2005. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature Immunology* **6**:1236-1244.
250. **Irie, K., P. M. Mohan, Y. Sasaguri, R. Putnak, and R. Padmanabhan.** 1989. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). *Gene* **75**:197-211.
251. **Isagulians, M. G.** 2003. Hepatitis C virus clearance: the enigma of failure despite an impeccable survival strategy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **4**:169-83.
252. **Ishida, S., M. Kaito, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohora, N. Fujita, J. Ikoma, Y. Adachi, and S. Watanabe.** 2001. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatology Research* **20**:335-347.
253. **Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta.** 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* **244**:30-44.

254. **Itano, A. A., and M. K. Jenkins.** 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology* **4**:733-9.
255. **Itano, A. A., S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, B. D. Ehst, E. Ingulli, A. Y. Rudensky, and M. K. Jenkins.** 2003. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* **19**:47-57.
256. **Iwasaki, A., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* **5**:987-95.
257. **Jakubzick, C., F. Tacke, F. Ginhoux, A. J. Wagers, N. van Rooijen, M. Mack, M. Merad, and G. J. Randolph.** 2008. Blood Monocyte Subsets Differentially Give Rise to CD103+ and CD103- Pulmonary Dendritic Cell Populations. *Journal of Immunology* **180**:3019-3027.
258. **Jankovic, D., M. C. Kullberg, S. Hieny, P. Caspar, C. M. Collazo, and A. Sher.** 2002. In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting. *Immunity* **16**:429-39.
259. **Janssen, E. M., N. M. Droin, E. E. Lemmens, M. J. Pinkoski, S. J. Bensinger, B. D. Ehst, T. S. Griffith, D. R. Green, and S. P. Schoenberger.** 2005. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**:88-93.
260. **Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath, and S. P. Schoenberger.** 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**:852-6.
261. **Jenkins, M. K., A. Khoruts, E. Ingulli, D. L. Mueller, S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, A. Itano, and K. A. Pape.** 2001. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annual Review of Immunology* **19**:23-45.
262. **Jiang, Z., T. W. Mak, G. Sen, and X. Li.** 2004. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:3533-8.
263. **Johnson, C. L., D. M. Owen, and M. Gale.** 2007. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. *Journal of Biological Chemistry* **282**:10792-10803.
264. **Jolicoeur, C., D. Hanahan, and K. M. Smith.** 1994. T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **91**:6707-6711.
265. **Jones, C.** 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Review* **16**:79-95.
266. **Jones, C. A., M. Fernandez, K. Herc, L. Bosnjak, M. Miranda-Saksena, R. A. Boadle, and A. Cunningham.** 2004. Herpes simplex virus type 2 induces rapid cell death and functional impairment of murine dendritic cells in vitro. *Journal of Virology* **77**:11139-49.
267. **Jopling, C. L., M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, and P. Sarnow.** 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**:1577-1581.

268. **Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Najj, and A. J. Caton.** 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology* **2**:301-306.
269. **Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Haggman, L. Gapin, and S. M. Kaech.** 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27**:281-295.
270. **Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman, and R. A. Lang.** 2002. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**:211-220.
271. **Kaech, S. M., and R. Ahmed.** 2001. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nature Immunology* **2**:415-422.
272. **Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh, and R. Ahmed.** 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunology* **4**:1191-1198.
273. **Kaech, S. M., and E. J. Wherry.** 2007. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* **27**:393-405.
274. **Kagan, J. C., and R. Medzhitov.** 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**:943-955.
275. **Kaimori, A., T. Kanto, L. C. Kwang, Y. Komoda, C. Oki, M. Inoue, H. Miyatake, I. Itose, M. Sakakibara, T. Yakushijin, T. Takehara, Y. Matsuura, and N. Hayashi.** 2004. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* **324**:74-83.
276. **Kalams, S. A., S. P. Buchbinder, E. S. Rosenberg, J. M. Billingsley, D. S. Colbert, N. G. Jones, A. K. Shea, A. K. Trocha, and B. D. Walker.** 1999. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology* **73**:6715-20.
277. **Kalams, S. A., and B. D. Walker.** 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of Experimental Medicine* **188**:2199-204.
278. **Kamezaki, K., K. Shimoda, A. Numata, T. Matsuda, K. Nakayama, and M. Harada.** 2004. The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *International Immunology* **16**:1173-9.
279. **Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, T. Tatsumi, N. Kuzushita, Ito A, Y. Sasaki, A. Kasahara, and M. Hori.** 1999. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *Journal of Immunology* **162**:5584-91.

280. **Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**:19-28.
281. **Kato, N., H. Sekiya, Y. Ootsuyama, T. Nakazawa, M. Hijikata, S. Ohkoshi, and K. Shimotohno.** 1993. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **67**:3923-30.
282. **Kaufmann, D. E., D. G. Kavanagh, F. Pereyra, J. J. Zaunders, E. W. Mackey, T. Miura, S. Palmer, M. Brockman, A. Rathod, A. Piechocka-Trocha, B. Baker, B. Zhu, S. Le Gall, M. T. Waring, R. Ahern, K. Moss, A. D. Kelleher, J. M. Coffin, G. J. Freeman, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker.** 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature Immunology* **8**:1246-1254.
283. **Kaukinen, P., M. Sillanpää, S. Kotenko, R. Lin, J. Hiscott, K. Melén, and I. Julkunen.** 2006. Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. *Virology Journal* **3**:66.
284. **Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**:115-22.
285. **Kawai, T., and S. Akira.** 2007. TLR signaling. *Seminars of Immunology* **19**:24-32.
286. **Keck, Z. Y., V. M. Sung, S. Perkins, J. Rowe, S. Paul, T. J. Liang, M. M. Lai, and S. K. Fong.** 2004. Human monoclonal antibody to hepatitis C virus E1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity. *Journal of Virology* **78**:7257-63.
287. **Kedl, R. M., and M. F. Mescher.** 1998. Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response. *Journal of Immunology* **161**:674-683.
288. **Keir, M. E., S. C. Liang, I. Guleria, Y. E. Latchman, A. Qipo, L. A. Albacker, M. Koulmanda, G. J. Freeman, M. H. Sayegh, and A. H. Sharpe.** 2006. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine* **203**:883-895.
289. **Khakoo, S. I., C. L. Thio, M. P. Martin, C. R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, J. Cheng, J. J. Goedert, D. Vlahov, M. Hilgartner, S. Cox, A. M. Little, G. J. Alexander, M. E. Cramp, S. J. O'Brien, W. M. Rosenberg, D. L. Thomas, and M. Carrington.** 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* **305**:872-4.
290. **Khanolkar, A., M. J. Fuller, and A. J. Zajac.** 2004. CD4 T cell-dependent CD8 T cell maturation. *Journal of Immunology* **172**:2834-2844.
291. **Khu, Y. L., Y. J. Tan, S. G. Lim, W. Hong, and P. Y. Goh.** 2004. Hepatitis C virus non-structural protein NS3 interacts with LMP7, a component of the immunoproteasome, and affects its proteasome activity. *Biochemistry Journal* **384**:401-409.

292. **King, I. L., and B. M. Segal.** 2005. IL-12 induces CD4⁺CD25⁻ T cell activation in the presence of T regulatory cells. *Journal of Immunology* **175**:641-645.
293. **Klebanoff, C. A., L. Gattinoni, P. Torabi-Parizi, K. Kerstann, A. R. Cardones, S. E. Finkelstein, D. C. Palmer, P. A. Antony, S. T. Hwang, S. A. Rosenberg, T. A. Waldmann, and N. P. Restifo.** 2005. Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102**:9571-9576.
294. **Klein, I., and I. N. Crispe.** 2006. Complete differentiation of CD8⁺ T cells activated locally within the transplanted liver. *Journal of Experimental Medicine* **203**:437-447.
295. **Klein, I., H. J. Gassel, and I. N. Crispe.** 2006. Cytotoxic T-cell response following mouse liver transplantation is independent of the initial site of T-cell priming. *Transplantation Proceedings* **38**:3241-3243.
296. **Klenerman, P., and A. Hill.** 2005. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nature Immunology* **6**:873-879.
297. **Klenerman, P., M. Lucas, E. Barnes, and G. Harcourt.** 2002. Immunity to hepatitis C virus: stunned but not defeated. *Microbes Infection* **4**:57-65.
298. **Klonowski, K. D., K. J. Williams, A. L. Marzo, and L. Lefrançois.** 2006. IL-7-independent regulation of IL-7 receptor alpha expression and memory CD8 T cell development. *Journal of Immunology* **177**:4247-4251.
299. **Kobayashi, T., P. T. Walsh, M. C. Walsh, K. M. Speirs, E. Chiffolleau, C. G. King, W. W. Hancock, J. H. Caamano, C. A. Hunter, P. Scott, L. A. Turka, and Y. Choi.** 2003. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity* **19**:353-63.
300. **Kolumam, G. A., S. Thomas, L. J. Thompson, J. Sprent, and K. Murali-Krishna.** 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine* **202**:637-650.
301. **Komurian-Pradel, F., A. Rajoharison, J. L. Berland, V. Khouri, M. Perret, M. Van Roosmalen, S. Pol, F. Negro, and G. Paranhos-Baccala.** 2004. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **40**:900-9.
302. **Korenaga, M., K. Hino, Y. Katoh, Y. Yamaguchi, M. Okuda, K. Yoshioka, and K. Okita.** 2001. A possible role of hypervariable region 1 quasispecies in escape of hepatitis C virus particles from neutralization. *Journal of Viral Hepatology* **8**:331-40.
303. **Korenaga, M., K. Hino, M. Okazaki, M. Okuda, and K. Okita.** 1997. Differences in hypervariable region 1 quasispecies between immune complexed and non-immune complexed hepatitis C virus particles. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* **240**:677-82.
304. **Koutsoudakis, G., E. Herrmann, S. Kallis, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann.** 2007. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *Journal of Virology* **81**:588-598.

305. **Kovacs, J. A., R. A. Lempicki, I. A. Sidorov, J. W. Adelsberger, I. Sereti, W. Sachau, G. Kelly, J. A. Metcalf, R. T. Davey, J. Falloon, M. A. Polis, J. Tavel, R. Stevens, L. Lambert, D. A. Hosack, M. Bosche, H. J. Issaq, S. D. Fox, S. Leitman, M. W. Baseler, H. Masur, M. Di Mascio, D. S. Dimitrov, and H. C. Lane.** 2005. Induction of prolonged survival of CD4+ T lymphocytes by intermittent IL-2 therapy in HIV-infected patients. *Journal of Clinical Investigation* **115**:2139-2148.
306. **Kovacsovics-Bankowski, M., and K. L. Rock.** 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**:243-6.
307. **Koziel, M. J., and B. D. Walker.** 1997. Characteristics of the intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response in chronic hepatitis C virus infection. *Springer Seminar of Immunopathology* **19**:69-83.
308. **Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, J. Hauber, and A. Steinkasserer.** 2000. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *Journal of Virology* **74**:7127-36.
309. **Kubo, Y., K. Takeuchi, S. Boonmar, T. Katayama, Q. L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, D. W. Bradley, M. Houghton, and I. Saito.** 1989. A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. *Nucleic Acids Research* **17**:10367-10372.
310. **Kudo, S., K. Matsuno, T. Ezaki, and M. Ogawa.** 1997. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *Journal of Experimental Medicine* **185**:777-784.
311. **Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker, and J. H. Strauss.** 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**:717-25.
312. **Kumar, H., S. Koyama, K. J. Ishii, T. Kawai, and S. Akira.** 2008. Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *Journal of immunology* **180**:683-687.
313. **Kuo, G., Q. L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, T. Miyamura, J. L. Dienstag, M. J. Alter, C. E. Stevens, G. E. Tegtmeier, F. Bonino, M. Colombo, W. S. Lee, C. Kuo, K. Berger, J. R. Shuster, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton.** 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **244**:362-364.
314. **Kurts, C., F. R. Carbone, M. Barnden, E. Blanas, J. Allison, W. R. Heath, and J. F. Miller.** 1997. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* **186**:2057-62.
315. **Kuzushita, N., N. Hayashi, T. Moribe, K. Katayama, T. Kanto, S. Nakatani, T. Kaneshige, T. Tatsumi, A. Ito, K. Mochizuki, Y. Sasaki, A. Kasahara, and M. Hori.** 1998. Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology* **27**:240-4.

316. **Kwissa, M., R. R. Amara, H. L. Robinson, B. Moss, S. Alkan, A. Jabbar, F. Villinger, and B. Pulendran.** 2007. Adjuvanting a DNA vaccine with a TLR9 ligand plus Flt3 ligand results in enhanced cellular immunity against the simian immunodeficiency virus. *Journal of Experimental Medicine* **204**:2733-2746.
317. **Kyle, J. L., P. R. Beatty, and E. Harris.** 2007. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *Journal of Infectious Disease* **195(12)**:1808-17:1808-1817.
318. **Lai, M. E., A. P. Mazzoleni, F. Argioli, S. De Virgillis, A. Balestrieri, R. H. Purcell, A. Cao, and P. Farci.** 1994. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* **343**:388-90.
319. **Lamarre, D., P. C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bös, D. R. Cameron, M. Cartier, M. G. Cordingley, A. M. Faucher, N. Goudreau, S. H. Kawai, G. Kukolj, L. Lagacé, S. R. LaPlante, H. Narjes, M. A. Poupert, J. Rancourt, R. E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y. S. Tsantrizos, S. M. Weldon, C. L. Yong, and M. Llinàs-Brunet.** 2003. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **426**:186-189.
320. **Lamprecht, P., F. Moosig, A. Gause, K. Herlyn, E. Csernok, H. Hansen, and W. L. Gross.** 2001. Immunological and clinical follow up of hepatitis C virus associated cryoglobulinaemic vasculitis. *Annual Rheumatoid Disease* **60**:385-90.
321. **Lancaster, T., E. Sanders, J. M. Christie, C. Brooks, S. Green, and W. M. Rosenberg.** 2002. Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatology* **9**:18-28.
322. **Landford, R. E., D. Chavez, F. V. Chisari, and C. Sureau.** 1995. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *Journal of Virology* **69**:8079-83.
323. **Landford, R. E., B. Guerra, H. Lee, D. R. Averett, B. Pfeiffer, D. Chavez, L. Notvall, and C. Bigger.** 2003. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Journal of Virology* **77**:1092-104.
324. **Lang, K. S., P. Georgiev, M. Recher, A. A. Navarini, A. Bergthaler, M. Heikenwalder, N. L. Harris, T. Junt, B. Odermatt, P. A. Clavien, H. Pircher, S. Akira, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 2006. Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *Journal of Clinical Investigation* **116**:2456-2463.
325. **Lang, K. S., M. Recher, T. Junt, A. A. Navarini, N. L. Harris, S. Freigang, B. Odermatt, C. Conrad, L. M. Ittner, S. Bauer, S. A. Luther, S. Uematsu, S. Akira, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 2005. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nature Medicine* **11**:138-145.

326. **Lanzavecchia, A., and F. Sallusto.** 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nature Immunology* **2**:487-92.
327. **Lanzavecchia, A., and F. Sallusto.** 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* **290**:92-7.
328. **Lanzavecchia, A., and F. Sallusto.** 2000. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Current Opinions in Immunology* **12**:92-8.
329. **Larsson, M., E. Babcock, A. Grakoui, N. Shoukry, G. Lauer, C. Rice, C. Walker, and N. Bhardwaj.** 2004. Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *Journal of Virology* **78**:6151-61.
330. **Laskus, T., E. A. Operskalski, M. Radkowski, J. Wilkinson, W. J. Mack, M. deGiacomo, L. Al-Harhi, Z. Chen, J. Xu, and A. Kovacs.** 2007. Negative-strand hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells from anti-HCV-positive/HIV-infected women. *Journal of Infectious Disease* **195**:124-133.
331. **Laskus, T., M. Radkowski, A. Piasek, M. Nowicki, A. Horban, J. Cianciara, and J. Rakela.** 2000. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfectd with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Journal of Infectious Disease* **181**:442-8.
332. **Laskus, T., M. Radkowski, L. F. Wang, J. Cianciara, H. Vargas, and J. Rakela.** 1997. Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extrahepatic replication. *Journal of General Virology* **78**:2747-50.
333. **Latchman, Y. E., S. C. Liang, Y. Wu, T. Chernova, R. A. Sobel, M. Klemm, V. K. Kuchroo, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe.** 2004. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:10691-10696.
334. **Lau, L. L., B. D. Jamieson, T. Somasundaram, and R. Ahmed.** 1994. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* **369**:648-652.
335. **Lauer, G. M., E. Barnes, M. Lucas, J. Timm, K. Ouchi, A. Y. Kim, C. L. Day, G. K. Robbins, D. R. Casson, M. Reiser, G. Dusheiko, T. M. Allen, R. T. Chung, B. D. Walker, and P. Klenerman.** 2004. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **127**:924-36.
336. **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. *Journal of Virology* **79**:12979-12988.
337. **Lechner, F., N. H. Gruener, S. Urbani, J. Uggeri, T. Santantonio, A. R. Kammer, A. Cerny, R. Phillips, C. Ferrari, G. R. Pape, and P.**

- Klenerman.** 2000. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *European Journal of Immunology* **30**:2479-87.
338. **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. *Journal of Experimental Medicine* **191**:1499-512.
339. **Lee, J. B., K. A. Lee, and J. Chang.** 2007. Phenotypic changes induced by IL-12 priming regulate effector and memory CD8 T cell differentiation. *International Immunology* **19**:1039-1048.
340. **Lee, W. C., M. C. Yu, Y. J. Chiang, H. C. Wang, L. Lu, and S. Qian.** 2005. Liver stellate cells suppress dendritic cells through IL-10. *Transplantation Proceedings* **37**:10-11.
341. **Lefrançois, L., and A. L. Marzo.** 2006. The descent of memory T-cell subsets. *Nature Review Immunology* **6**:618-623.
342. **Lennert, K., E. Kaiserling, and H. K. Muller-Hermelink.** 1975. Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* **1**:1031-2.
343. **Lerat, H., F. Berby, M. A. Trabaud, O. Vidalin, M. Major, C. Trepo, and G. Inchauspe.** 1996. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *Journal of Clinical Investigation* **97**:845-51.
344. **Lerat, H., S. Rumin, F. Habersetzer, F. Berby, M. A. Trabaud, C. Trepo, and G. Inchauspe.** 1998. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* **91**:3841-9.
345. **Levy, S., S. C. Todd, and H. T. Maecker.** 1998. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annual Review of Immunology* **16**:89-109.
346. **Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, and S. M. Lemon.** 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102**:2992-2997.
347. **Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, and S. M. Lemon.** 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102**:2992-7.
348. **Li, X., L. J. Jeffers, L. Shao, K. R. Reddy, M. de Medina, J. Scheffel, B. Moore, and E. R. Schiff.** 1995. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *Journal of Viral Hepatology* **2**:227-34.
349. **Li, X. D., L. Sun, R. B. Seth, G. Pineda, and Z. J. Chen.** 2006. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102**:17717-17722.
350. **Lian, Z. X., T. Okada, X. S. He, H. Kita, Y. J. Liu, A. A. Ansari, K. Kikuchi, S. Ikehara, and M. E. Gershwin.** 2003. Heterogeneity of dendritic

- cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *Journal of Immunology* **170**:2323-2330.
351. **Libraty, D. H., S. Pichyangkul, C. Ajariyakhajorn, T. P. Endy, and F. A. Ennis.** 2001. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *Journal of Virology* **75**:3501-8.
352. **Lichterfeld, M., D. E. Kaufmann, X. G. Yu, S. K. Mui, M. M. Addo, M. N. Johnston, D. Cohen, G. K. Robbins, E. Pae, G. Alter, A. Wurcel, D. Stone, E. S. Rosenberg, B. D. Walker, and M. Altfeld.** 2004. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* **200**:701-712.
353. **Limmer, A., J. Ohl, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold, and P. A. Knolle.** 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature Medicine* **6**:1348-54.
354. **Lin, R., J. Lacoste, P. Nakhaei, Q. Sun, L. Yang, S. Paz, P. Wilkinson, I. Julkunen, D. Vitour, E. Meurs, and J. Hiscott.** 2006. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *Journal of Virology* **80**:6072-6083.
355. **Lin, W., W. H. Choe, Y. Hiasa, Y. Kamegaya, J. T. Blackard, E. V. Schmidt, and R. T. Chung.** 2005. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* **128**:1034-41.
356. **Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wölk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice.** 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623-626.
357. **Lindenbach, B. D., P. Meuleman, A. Ploss, T. Vanwolleghem, A. J. Syder, J. A. McKeating, R. E. Lanford, S. M. Feinstone, M. E. Major, G. Leroux-Roels, and C. M. Rice.** 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**:3805-3809.
358. **Lindenbach, B. D., and C. M. Rice.** 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* **436**:933-938.
359. **Liu, Y. J.** 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**:259-62.
360. **Liu, Y. J.** 2004. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology*.
361. **Liu, Y. J., H. Kanzler, V. Soumelis, and M. Gilliet.** 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology* **2**:585-9.
362. **Liu, Z. X., H. Nishida, J. W. He, M. M. Lai, N. Feng, and G. Dennert.** 2004. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. *Journal of Virology* **76**:990-7.
363. **Logvinoff, C., M. E. Major, D. Oldach, S. Heyward, A. Talal, P. Balfe, S. M. Feinstone, H. Alter, C. M. Rice, and J. A. McKeating.** 2004.

- Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:10149-10154.
364. **Lohmann, V., F. Korner, U. Herian, and R. Bartenschlager.** 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology* **71**:8416-28.
365. **Longman, R. S., A. H. Talal, I. M. Jacobson, M. L. Albert, and C. M. Rice.** 2004. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* **103**:1026-9.
366. **Longman, R. S., A. H. Talal, I. M. Jacobson, C. M. Rice, and M. L. Albert.** 2005. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Infectious Disease* **192**:497-503:497-503.
367. **Loo, Y. M., D. M. Owen, K. Li, A. K. Erickson, C. L. Johnson, P. M. Fish, D. S. Carney, T. Wang, H. Ishida, M. Yoneyama, T. Fujita, T. Saito, W. M. Lee, C. H. Hagedorn, D. T. Lau, S. A. Weinman, S. M. Lemon, and M. Gale.** 2006. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**:6001-6006.
368. **Lorenz, I. C., J. Marcotrigiano, T. G. Dentzer, and C. M. Rice.** 2006. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**:831-835.
369. **Lozach, P. Y., L. Burleigh, I. Staropoli, E. Navarro-Sanchez, J. Harriague, J. L. Virelizier, F. A. Rey, P. Desprès, F. Arenzana-Seisdedos, and A. Amara.** 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *Journal of Biological Chemistry* **280**:23698-23708.
370. **Lu, H., W. Li, W. S. Noble, D. Payan, and D. C. Anderson.** 2004. Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *Journal of Proteome Research* **35**:949-57.
371. **Lu, H. H., and E. Wimmer.** 1996. Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**:1412-7.
372. **Lukavsky, P. J., I. Kim, G. A. Otto, and J. D. Puglisi.** 2003. Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nature Structural Molecular Biology* **10**:1033-8.
373. **Lytle, J. R., L. Wu, and H. D. Robertson.** 2002. Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *RNA* **8**:1045-55.
374. **Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, and A. O'Garra.** 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *Journal of Immunology* **154**:5071-9.
375. **Mackenzie, J. M., and E. G. Westaway.** 2001. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic

- reticulum and along the secretory pathway, respectively. *Journal of Virology* **75**:10787-99.
376. **Maggi, F., C. Fornai, M. L. Vatteroni, M. Giorgi, A. Morrica, M. Pistello, G. Cammarota, S. Marchi, P. Ciccorossi, A. Bionda, and M. Bendinelli.** 1997. Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *Journal of General Virology* **78**:1521-5.
377. **Major, M. E., K. Mihalik, M. Puig, B. Rehermann, M. Nascimbeni, C. M. Rice, and S. M. Feinstone.** 2002. Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *Journal of Virology* **76**:6586-95.
378. **Malathi, K., B. Dong, M. Gale, and R. H. Silverman.** 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**:816-819.
379. **Mangia, A., R. C. Gentile, I. , M. Margaglione, M. R. Villani, F. Stella, G. Modola, V. Agostiano, C. Gaudiano, and A. Andriulli.** 1999. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *Journal of Hepatology* **30**:984-9.
380. **Manjunath, N., P. Shankar, J. Wan, W. Weninger, M. A. Crowley, K. Hieshima, T. A. Springer, X. Fan, H. Shen, J. Lieberman, and U. H. von Andrian.** 2001. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation* **108**:871-878.
381. **Manns, M. P., G. R. Foster, J. K. Rockstroh, S. Zeuzem, F. Zoulim, and M. Houghton.** 2007. The way forward in HCV treatment - finding the right path. *Nature Review Drug Discovery* **6**:991-1000.
382. **Mansell, A., R. Smith, S. L. Doyle, P. Gray, J. E. Fenner, P. J. Crack, S. E. Nicholson, D. J. Hilton, L. A. O'Neill, and P. J. Hertzog.** 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nature Immunology* **7**:148-155.
383. **Marzo, A. L., K. D. Klonowski, A. Le Bon, P. Borrow, D. F. Tough, and L. Lefrançois.** 2005. Initial T cell frequency dictates memory CD8⁺ T cell lineage commitment. *Nature Immunology* **6**:793-799.
384. **Marzo, A. L., H. Yagita, and L. Lefrançois.** 2007. Migration to nonlymphoid tissues results in functional conversion of central to effector memory CD8 T cells. *Journal of Immunology* **179**:36-40.
385. **Masopust, D., K. Murali-Krishna, and R. Ahmed.** 2007. Quantitating the magnitude of the lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8 T-cell response: it is even bigger than we thought. *Journal of Virology* **81**:2002-2011.
386. **Masopust, D., V. Vezys, A. L. Marzo, and L. Lefrançois.** 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**:2413-2417.
387. **Matloubian, M., R. J. Concepcion, and R. Ahmed.** 1994. CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of Virology* **68**:8056-63.

388. **Matsui, M., O. Moriya, N. Abdel-Aziz, Y. Matsuura, T. Miyamura, and T. Akatsuka.** 2002. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine* **21**:211-20.
389. **Matzinger, P.** 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**:301-305.
390. **Maylin, S., M. Martinot-Peignoux, R. Moucari, N. Boyer, M. P. Ripault, D. Cazals-Hatem, N. Giully, C. Castelnau, A. C. Cardoso, T. Asselah, C. Féray, M. H. Nicolas-Chanoine, P. Bedossa, and P. Marcellin.** 2008. Eradication of Hepatitis C Virus in Patients Successfully Treated for Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* doi:10.1053/j.gastro.2008.05.044.
391. **McDonald, W. F., J. W. Huleatt, H. G. Foellmer, D. Hewitt, J. Tang, P. Desai, A. Price, A. Jacobs, V. N. Takahashi, Y. Huang, V. Nakaar, L. Alexopoulou, E. Fikrig, and T. J. Powell.** 2007. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *Journal of Infectious Disease* **195**:1607-1617.
392. **McGavern, D. B., U. Christen, and M. B. Oldstone.** 2002. Molecular anatomy of antigen-specific CD8(+) T cell engagement and synapse formation in vivo. *Nature Immunology* **3**:918-925.
393. **McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope, and B. Martoglio.** 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO Journal* **21**:3980-8.
394. **McWhirter, S. M., K. A. Fitzgerald, J. Rosains, D. C. Rowe, D. T. Golenbock, and T. Maniatis.** 2004. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:233-238.
395. **Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway.** 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-397.
396. **Mehta, S. H., A. Cox, D. R. Hoover, X. H. Wang, Q. Mao, S. Ray, S. A. Strathdee, D. Vlahov, and D. L. Thomas.** Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* **359**:1478-83.
397. **Mellman, I., and R. M. Steinman.** 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**:255-8.
398. **Mellor, J., G. Haydon, C. Blair, W. Livingstone, and P. Simmonds.** 1998. Low level or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of General Virology* **79**:705-14.
399. **Mempel, T. R., S. E. Henrickson, and V. A. U.H.** 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**:154-159.
400. **Menges, M., S. Rössner, C. Voigtländer, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, and M. B. Lutz.** 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* **195**:15-21.

401. **Mengshol, J. A., L. Golden-Mason, and H. R. Rosen.** 2007. Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nature Clinical Practice in Gastroenterology and Hepatology* **4**:622-634.
402. **Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp.** 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nature Immunology* **5**:503-507.
403. **Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp.** 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**:1167-1172.
404. **Migueles, S. A., A. C. Laborico, W. L. Shupert, M. S. Sabbaghian, R. Rabin, C. W. Hallahan, D. Van Baarle, S. Kostense, F. Miedema, M. McLaughlin, L. Ehler, J. Metcalf, S. Liu, and M. Connors.** 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature Immunology* **3**:1061-1068.
405. **Miller, M. J., A. S. Hejazi, S. H. Wei, M. D. Cahalan, and I. Parker.** 2004. T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:998-1003.
406. **Miller, M. J., O. Safrina, I. Parker, and M. D. Cahalan.** 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine* **200**:847-856.
407. **Miller, R. H., and R. H. Purcell.** 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**:2057-61.
408. **Minkyung, Y., and S. M. Lemon.** 2003. Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* **9**:331-45.
409. **Minton, E. J., D. Smillie, K. R. Neal, W. L. Irving, J. C. Underwood, and V. James.** 1998. Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. Members of the Trent Hepatitis C Virus Study Group. *Journal of Infectious Disease* **178**:39-44.
410. **Missale, G., R. Bertoni, V. Lamonaca, A. Valli, M. Massari, C. Mori, M. G. Rumi, M. Houghton, F. Fiaccadori, and C. Ferrari.** 1996. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *Journal of Clinical Investigation* **98**:706-14.
411. **Mittelbrunn, M., M. Yanez-Mo, D. Sancho, A. Ursa, and F. Sanchez-Madrid.** 2002. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *Journal of Immunology* **169**:6691-5.
412. **Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno.** 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* **9**:1089-1097.

413. **Moradpour, D., F. Penin, and C. M. Rice.** 2007. Replication of Hepatitis C virus. *Nature Review Microbiology* **6**:453-463.
414. **Mothé, B. R., B. S. Stewart, C. Oseroff, H. H. Bui, S. Stogiera, Z. Garcia, C. Dow, M. P. Rodriguez-Carreno, M. Kotturi, V. Pasquetto, J. Botten, S. Crotty, E. Janssen, M. J. Buchmeier, and A. Sette.** 2007. Chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection actively down-regulates CD4+ T cell responses directed against a broad range of epitopes. *Journal of Immunology* **179**:1058-1067.
415. **Mueller, S. N., M. Matloubian, D. M. Clemens, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, S. Gangappa, C. P. Larsen, and R. Ahmed.** 2007. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**:15430-15435.
416. **Mukhopadhyay, S., B. S. Kim, P. R. Chipman, M. G. Rossmann, and R. J. Kuhn.** 2003. Structure of West Nile virus. *Science* **302**:248.
417. **Murali-Krishna, K., J. D. Altman, M. Suresh, D. J. Sourdive, A. J. Zajac, J. D. Miller, J. Slansky, and R. Ahmed.** 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**:177-187.
418. **Muratori, L., D. Gibellini, M. Lenzi, M. Cataleta, P. Muratori, M. C. Morelli, and F. B. Bianchi.** 1996. Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* **88**:2768-74.
419. **Naka, T., M. Fujimoto, H. Tsutsui, and A. Yoshimura.** 2005. Negative regulation of cytokine and TLR signalings by SOCS and others. *Advanced Immunology* **87**:61-122.
420. **Nakamoto, N., D. E. Kaplan, J. Coleclough, Y. Li, M. Kaminski, A. Shaked, K. Olthoff, E. Gostick, D. A. Price, G. J. Freeman, E. J. Wherry, and K.-M. Chang.** 2008. Functional restoration of HCV-specific CD8 T-cells by PD1 blockade is defined by PD1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* doi:10.1053/j.gastro.2008.02.033.
421. **Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, A. Amara, O. Schwartz, F. Fieschi, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and P. Despres.** 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Report* **4**:723-8.
422. **Navas, M. C., A. Fuchs, E. Schvoerer, A. Bohbot, A. M. Aubertin, and F. Stoll-Keller.** 2002. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *Journal of Medical Virology* **67**:152-61.
423. **Navas, S., J. Martin, J. A. Quiroga, I. Castillo, and V. Carreno.** 1998. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients. *Journal of Virology* **72**:1640-6.
424. **Nelson, D. R., C. G. Marousis, G. L. Davis, C. M. Rice, J. Wong, M. Houghton, and J. Y. Lau.** 1997. The role of hepatitis C virus-specific

- cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *Journal of Immunology* **158**:1473-81.
425. **Nembrini, C., B. Abel, M. Kopf, and B. J. Marsland.** 2006. Strong TCR signaling, TLR ligands, and cytokine redundancies ensure robust development of type 1 effector T cells. *Journal of Immunology* **176**:7180-7188.
426. **Newberry, R. D., J. S. McDonough, W. F. Stenson, and R. G. Lorenz.** 2001. Spontaneous and continuous cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 production by stromal cells in the murine small intestine lamina propria: directing the tone of the intestinal immune response. *Journal of Immunology* **166**:4465-4472.
427. **Newberry, R. D., W. F. Stenson, and R. G. Lorenz.** 1999. Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nature Medicine* **5**:900-906.
428. **Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo.** 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**:141-151.
429. **Nolte, M. A., S. Leibundgut-Landmann, O. Joffre, and C. Reis e Sousa.** 2007. Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1487-1501.
430. **Northfield, J. W., V. Kasprovicz, M. Lucas, N. Kersting, B. Bengsh, A. Kim, R. E. Phillips, B. D. Walker, R. Thimme, G. Lauer, and P. Klenerman.** 2008. CD161 expression on hepatitis C virus-specific CD8+ T cells suggests a distinct pathway of T cell differentiation. *Hepatology* **47**:396-406.
431. **Northrop, J. K., R. M. Thomas, A. D. Wells, and H. Shen.** 2006. Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *Journal of Immunology* **177**:1062-1069.
432. **Oehen, S., and K. Brduscha-Riem.** 1998. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *Journal of Immunology* **161**:5338-5346.
433. **Oganesyan, G., S. K. Saha, B. Guo, J. Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng.** 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**:208-211.
434. **Okazaki, T., and T. Honjo.** 2006. Rejuvenating exhausted T cells during chronic viral infection. *Cell* **124**:459-461.
435. **Okazaki, T., A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, and T. Honjo.** 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **98**:13866-13871.
436. **Okoye, A., M. Meier-Schellersheim, J. M. Brenchley, S. I. Hagen, J. M. Walker, M. Rohankhedkar, R. Lum, J. B. Edgar, S. L. Planer, A. Legasse, A. W. Sylwester, M. Piatak, J. D. Lifson, V. C. Maino, D. L. Sodora, D. C. Douek, M. K. Axthelm, Z. Grossman, and L. J. Picker.** 2007. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+

- effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *Journal of Experimental Medicine* **204**:2171-2185.
437. **O'Neill, L. A., and A. G. Bowie.** 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Review Immunology* **7**:353-364.
438. **Op De Beeck, A., and J. Dubuisson.** 2003. Topology of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Review of Medical Virology* **13**:233-41.
439. **Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein.** 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**:715-25.
440. **Orland, J. R., T. L. Wright, and S. Cooper.** 2001. Acute hepatitis C. *Hepatology* **33**:321-7.
441. **Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya.** 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *Journal of Biological Chemistry* **278**:49751-49762.
442. **Otsuka, M., N. Kato, M. Moriyama, H. Taniguchi, Y. Wang, N. Dharel, T. Kawabe, and M. Omata.** 2005. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* **41**:1004-12.
443. **Oxenius, A., R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 1998. Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4+ and CD8+ T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity* **9**:449-57.
444. **Pachiadakis, I., G. Pollara, B. M. Chain, and N. V. Naoumov.** 2006. Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infectious Disease* **5**:296-304.
445. **Pape, G. R., T. J. Gerlach, H. M. Diepolder, N. Gruner, M. Jung, and T. Santantonio.** 1999. Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus. *Journal of Viral Hepatology* **6**:36-40.
446. **Parry, R. V., J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth, A. R. Lanfranco, I. Braunstein, S. V. Kobayashi, P. S. Linsley, C. B. Thompson, and J. L. Riley.** 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular Cell Biology*:9543-9553.
447. **Pasare, C., and R. Medzhitov.** 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**:1033-6.
448. **Pasare, C., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* **21**:733-41.
449. **Pasare, C., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Seminars in Immunology* **16**:23-6.
450. **Pedersen, I. M., G. Cheng, S. Wieland, S. Volinia, C. M. Croce, F. V. Chisari, and M. David.** 2007. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* **449**:919-922.

451. **Peixoto, A., C. Evaristo, I. Munitic, M. Monteiro, A. Charbit, B. Rocha, and H. Veiga-Fernandes.** 2007. CD8 single-cell gene coexpression reveals three different effector types present at distinct phases of the immune response. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1193-1205.
452. **Pendl, G. G., C. Robert, M. Steinert, R. Thanos, R. Eytner, E. Borges, M. K. Wild, J. B. Lowe, R. C. Fuhlbrigge, T. S. Kupper, D. Vestweber, and S. Grabbe.** 2002. Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood* **99**:946-56.
453. **Peng, G., S. Li, W. Wu, X. Tan, Y. Chen, and Z. Chen.** 2008. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Molecular Immunology* **45**:963-970.
454. **Penna, A., M. Pilli, A. Zerbini, A. Orlandini, S. Mezzadri, L. Sacchelli, G. Missale, and C. Ferrari.** 2007. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **45**:588-601.
455. **Perry, A. K., E. K. Chow, J. B. Goodnough, W. C. Yeh, and G. Cheng.** 2004. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *Journal of Experimental Medicine* **199**:1651-1658.
456. **Petrovas, C., J. P. Casazza, J. M. Brenchley, D. A. Price, E. Gostick, W. C. Adams, M. L. Precopio, T. Schacker, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup.** 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *Journal of Experimental Medicine* **203**:2281-2292.
457. **Petrovas, C., D. A. Price, J. Mattapallil, D. R. Ambrozak, C. Geldmacher, V. Cecchinato, M. Vaccari, E. Tryniszewska, E. Gostick, M. Roederer, D. C. Douek, S. H. Morgan, S. J. Davis, G. Franchini, and R. A. Koup.** 2007. SIV-specific CD8+ T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection. *Blood* **110**:928-936.
458. **Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, J. L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T. K. McClanahan, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. de Waal-Malefyt, D. Rennick, and R. A. Kastelein.** 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* **61**:779-90.
459. **Pham, T. N., D. King, S. A. Macparland, J. S. McGrath, S. B. Reddy, F. R. Bursey, and T. I. Michalak.** 2007. Hepatitis C Virus Replicates in the Same Immune Cell Subsets in Chronic Hepatitis C and Occult Infection. *Gastroenterology* doi:10.1053/j.gastro.2007.12.011.
460. **Pham, T. N., S. A. Macparland, C. S. Coffin, S. S. Lee, F. R. Bursey, and T. I. Michalak.** 2005. Mitogen-induced upregulation of hepatitis C virus expression in human lymphoid cells. *Journal of General Virology* **86**:657-666.
461. **Pham, T. N., S. A. MacParland, P. M. Mulrooney, H. Cooksley, N. V. Naoumov, and T. I. Michalak.** 2004. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *Journal of Virology* **78**:5867-74.

462. **Pham, T. N., P. M. Mulrooney-Cousins, S. E. Mercer, S. A. MacParland, M. Ingot, M. Zalewska, K. Simon, and T. I. Michalak.** 2007. Antagonistic expression of hepatitis C virus and alpha interferon in lymphoid cells during persistent occult infection. *Journal of Viral Hepatology* **14**:537-548.
463. **Pichlmair, A., and C. Reis e Sousa.** 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity* **27**:370-383.
464. **Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Näslund, P. Liljeström, F. Weber, and C. Reis e Sousa.** 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**:997-1001.
465. **Pihlgren, M., P. M. Dubois, M. Tomkowiak, T. Sjögren, and J. Marvel.** 1996. Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *Journal of Experimental Medicine* **184**:2141-2151.
466. **Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani.** 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**:938-41.
467. **Pokidysheva, E., Y. Zhang, A. J. Battisti, C. M. Bator-Kelly, P. R. Chipman, C. Xiao, G. G. Gregorio, W. A. Hendrickson, R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann.** 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* **124**:485-493.
468. **Prince, A. M.** 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **60**:814-821.
469. **Prince, A. M., B. Brotman, T. Huima, D. Pascual, M. Jaffery, and G. Inchauspe.** 1992. Immunity in hepatitis C infection. *Journal of Infectious Disease* **165**:438-43.
470. **Probst, H. C., J. Lagnel, G. Kollias, and M. van den Broek.** 2003. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity* **18**:713-720.
471. **Probst, H. C., K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek.** 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature Immunology* **6**:280-286.
472. **Pulendran, B., and R. Ahmed.** 2006. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**:849-863.
473. **Pulendran, B., K. Palucka, and J. Banchereau.** 2001. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* **293**:253-6.
474. **Racanelli, V., and R. B.** 2003. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends in Immunology* **24**:456-64.
475. **Racanelli, V., and B. Rehermann.** 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**:54-62.
476. **Radkowski, M., A. Bednarska, A. Horban, J. Stanczak, J. Wilkinson, D. M. Adair, M. Nowicki, J. Rakela, and T. Laskus.** 2004. Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. *Journal of General Virology* **85**:47-59.
477. **Radkowski, M., J. F. Gallegos-Orozco, J. Jablonska, T. V. Colby, B. Walewska-Zielecka, J. Kubicka, J. Wilkinson, D. Adair, J. Rakela, and T.**

- Laskus.** 2005. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* **41**:106-14.
478. **Radkowski, M., A. Horban, J. F. Gallegos-Orozco, A. Pawelczyk, J. Jablonska, J. Wilkinson, D. Adair, and T. Laskus.** 2005. Evidence for viral persistence in patients who test positive for anti-hepatitis C virus antibodies and have normal alanine aminotransferase levels. *Journal of Infectious Disease* **191**:1730-3.
479. **Radziewicz, H., C. C. Ibegbu, M. L. Fernandez, K. A. Workowski, K. Obideen, M. Wehbi, H. L. Hanson, J. P. Steinberg, D. Masopust, E. J. Wherry, J. D. Altman, B. T. Rouse, G. J. Freeman, R. Ahmed, and A. Grakoui.** 2007. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *Journal of Virology* **81**:2545-2553.
480. **Raftery, M. J., M. Schwab, S. M. Eibert, Y. Samstag, H. Walczak, and G. Schonrich.** 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* **15**:997-1009.
481. **Randolph, G. J., S. Beaulieu, S. Lebecque, R. M. Steinman, and W. A. Muller.** 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**:480-3.
482. **Randolph, G. J., S. Beaulieu, S. Lebecque, R. M. Steinman, and W. A. Muller.** 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**:480-483.
483. **Randolph, G. J., K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman, and W. A. Muller.** 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**:753-61.
484. **Randolph, G. J., G. Sanchez-Schmitz, R. M. Liebman, and K. Schakel.** 2002. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *Journal of Experimental Medicine* **196**:517-27.
485. **Reed, K. E., and C. M. Rice.** 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **242**:55-84.
486. **Rehermann, B.** 2000. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Seminars of Liver Disease* **20**:127-41.
487. **Rehermann, B., K. M. Chang, J. McHutchinson, R. Kokka, M. Houghton, C. M. Rice, and F. V. Chisari.** 1996. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *Journal of Virology* **70**:7092-102.
488. **Rehermann, B., K. M. Chang, J. G. McHutchison, R. Kokka, M. Houghton, and F. V. Chisari.** 1996. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Investigation* **98**:1432-40.
489. **Reis e Sousa, C.** 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature Review Immunology* **6**:476-483.
490. **Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli.**

2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology* **2**:361-367.
491. **Ridge, J. P., F. Di Rosa, and P. Matzinger.** 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**:474-478.
492. **Riegler, S., H. Hebart, H. Einsele, P. Brossart, G. Jahn, and C. Sinzger.** 2000. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology* **81**:393-9.
493. **Roberts, A. D., K. H. Ely, and D. L. Woodland.** 2005. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *Journal of Experimental Medicine* **202**:123-133.
494. **Roberts, A. D., and D. L. Woodland.** 2004. Effector memory CD8⁺ T cells play a prominent role in recall responses to secondary viral infection in the lung. *Journal of Immunology* **172**:6533-6537.
495. **Rodig, N., T. Ryan, J. A. Allen, H. Pang, N. Grabie, T. Chernova, E. A. Greenfield, S. C. Liang, A. H. Sharpe, A. H. Lichtman, and G. J. Freeman.** 2003. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8⁺ T cell activation and cytolysis. *European Journal of Immunology* **33**:3117-3126.
496. **Rodrigue-Gervais, I. G., L. Jouan, G. Beaulé, D. Sauvé, J. Bruneau, B. Willems, R. P. Sékaly, and D. Lamarre.** 2007. Poly(I:C) and LPS innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in Hepatitis C virus-infected patients. *Journal of Virology* **81**:5537-46.
497. **Rollier, C., E. Depla, J. A. Drexhage, E. J. Verschoor, B. E. Verstrepen, A. Fatmi, C. Brinster, A. Fournillier, J. A. Whelan, M. Whelan, D. Jacobs, G. Maertens, G. Inchauspe, and J. L. Heeney.** 2004. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *Journal of Virology* **78**:187-96.
498. **Rollier, C., J. A. Drexhage, B. E. Verstrepen, E. J. Verschoor, R. E. Bontrop, G. Koopman, and J. L. Heeney.** 2003. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* **38**:851-8.
499. **Rollier, C. S., G. Paranhos-Baccala, E. J. Verschoor, B. E. Verstrepen, J. A. Drexhage, Z. Fagrouch, J. L. Berland, F. Komurian-Pradel, B. Duverger, N. Himoudi, C. Staib, M. Meyr, M. Whelan, J. A. Whelan, V. C. Adams, E. Larrea, J. I. Riezu, J. J. Lasarte, B. Bartosch, F. L. Cosset, W. J. Spaan, H. M. Diepolder, G. R. Pape, G. Sutter, G. Inchauspe, and J. L. Heeney.** 2007. Vaccine-induced early control of hepatitis C virus infection in chimpanzees fails to impact on hepatic PD-1 and chronicity. *Hepatology* **45**:602-613.
500. **Roque Afonso, A. M., J. Jiang, F. Penin, C. Tareau, D. Samuel, M. A. Petit, H. Bismuth, E. Dussaix, and C. Feray.** 1999. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *Journal of Virology* **73**:9213-21.

501. **Roque-Afonso, A. M., D. Ducoulombier, G. Di Liberto, R. Kara, M. Gigou, E. Dussaix, D. Samuel, and C. Féray.** 2005. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *79*:6349-6357.
502. **Rosa, D., S. Campagnoli, C. Moretto, E. Guenzi, L. Cousens, M. Chin, C. Dong, A. J. Weiner, J. Y. Lau, Q. L. Choo, D. Chien, P. Pileri, M. Houghton, and S. Abrignani.** 1996. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**:1759-63.
503. **Rosen, H. R., D. J. Hinrichs, D. R. Gretch, M. J. Koziel, S. Chou, M. Houghton, J. Rabkin, C. L. Corless, and H. G. Bower.** 1999. Association of multispecific CD4(+) response to hepatitis C and severity of recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology* **117**:926-32.
504. **Rosen, H. R., C. Miner, A. W. Sasaki, D. M. Lewinsohn, A. J. Conrad, A. Bakke, H. G. Bower, and D. J. Hinrichs.** 2002. Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology* **35**:190-8.
505. **Rotta, G., E. W. Edwards, S. Sangaletti, C. Bennett, S. Ronzoni, M. P. Colombo, R. M. Steinman, G. J. Randolph, and M. Rescigno.** 2003. Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **198**:1253-1263.
506. **Rowe, D. C., A. F. McGettrick, E. Latz, B. G. Monks, N. J. Gay, M. Yamamoto, S. Akira, L. A. O'Neill, K. A. Fitzgerald, and D. T. Golenbock.** 2006. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**:6299-6304.
507. **Roy, C. R., and E. S. Mocarski.** 2007. Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nature Immunology* **8**:1179-1187.
508. **Sakuntabhai, A., C. Turbpaiboon, I. Casadémont, A. Chuansumrit, T. Lowhnoo, A. Kajaste-Rudnitski, S. M. Kalayanarooj, K. Tangnararatchakit, N. Tangthawornchaikul, S. Vasanawathana, W. Chaiyaratana, P. T. Yenchitsomanus, P. Suriyaphol, P. Avirutnan, K. Chokephaibulkit, F. Matsuda, S. Yoksan, Y. Jacob, G. M. Lathrop, P. Malasit, P. Desprès, and C. Julier.** 2005. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature Genetic* **37**:507-513.
509. **Salio, M., M. J. Palmowski, A. Atzberger, I. F. Hermans, and V. Cerundolo.** 2004. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *Journal of Experimental Medicine* **199**:567-579.
510. **Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia.** 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual Review Immunology* **22**:745-763.
511. **Sallusto, F., and A. Lanzavecchia.** 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunology Review* **177**:134-40.

512. **Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia.** 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology* **28**:2760-9.
513. **Sanchez, P. J., J. A. McWilliams, C. Haluszczak, H. Yagita, and R. M. Kedl.** Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo. *Journal of Immunology* **178**:1564-1572.
514. **Sansonno, D., A. R. Iacobelli, V. Cornacchiulo, G. Iodice, and F. Dammacco.** 1996. Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Journal of Clinical Experimental Immunology* **103**:414-21.
515. **Sansonno, D., C. Lotesoriere, V. Cornacchiulo, M. Fanelli, P. Gatti, G. Iodice, V. Racanelli, and F. Dammacco.** 1998. Hepatitis C virus infection involves CD34(+) hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. *Blood* **92**:3328-37.
516. **Sapozhnikov, A., J. A. Fischer, T. Zaft, R. Krauthgamer, A. Dzionek, and S. Jung.** 2007. Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1923-1933.
517. **Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology* **171**:4304-4310.
518. **Satoh, S., M. Hirota, T. Noguchi, M. Hijikata, H. Handa, and K. Shimotohno.** 2000. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* **270**:476-87.
519. **Saunier, B., M. Triyatni, L. Ulianich, P. Maruvada, P. Yen, and L. D. Kohn.** 2003. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *Journal of Virology* **77**:546-59.
520. **Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R. M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, and R. V. A. Cortese.** 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO Journal* **21**:5017-25.
521. **Schildberg, F. A., S. I. Hegenbarth, B. Schumak, A. Limmer, and P. A. Knolle.** 2008. Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *European Journal of Immunology* **38**:957-967.
522. **Schirren, C. A., M. C. Jung, J. T. Gerlach, T. Worzfeld, G. Baretton, M. Mamin, N. Hubert Gruener, M. Houghton, and G. R. Pape.** 2000. Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma. *Hepatology* **32**:597-603.

523. **Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, and L. Lefrançois.** 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunology* **1**:426-432.
524. **Schmidt, C. S., and M. F. Mescher.** 1999. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *Journal of Immunology* **163**:2561-7.
525. **Schmidt, C. S., and M. F. Mescher.** 2002. Peptide antigen priming of naïve, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *Journal of Immunology* **168**:5521-9.
526. **Schmidt, W. N., J. T. Stapleton, D. R. LaBrecque, F. A. Mitros, P. A. Kirby, M. J. Phillips, and D. L. Brashear.** 2000. Hepatitis C virus (HCV) infection and cryoglobulinemia: analysis of whole blood and plasma HCV-RNA concentrations and correlation with liver histology. *Hepatology* **31**:737-44.
527. **Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov.** 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunology* **2**:947-50.
528. **Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Näslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljeström, and C. Reis e Sousa.** 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**:887-892.
529. **Schulze zur Wiesch J, L. G., Day CL, Kim AY, Ouchi, K., J. E. Duncan, A. G. Wurcel, J. Timm, A. M. Jones, B. Mothe, T. M. Allen, B. McGovern, L. Lewis-Ximenez, J. Sidney, A. Sette, R. T. Chung, and B. D. Walker.** 2005. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *Journal of Immunology* **175**:3603-3613.
530. **Schupper, H., P. Hayashi, J. Scheffel, S. Aceituno, T. Paglieroni, P. V. Holland, and J. B. Zeldis.** 1993. Peripheral-blood mononuclear cell responses to recombinant hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **18**:1055-60.
531. **Seaman, M. S., F. W. Peyerl, S. S. Jackson, M. A. Lifton, D. A. Gorgone, J. E. Schmitz, and N. L. Letvin.** 2004. Subsets of memory cytotoxic T lymphocytes elicited by vaccination influence the efficiency of secondary expansion in vivo. *Journal of Virology* **78**:206-215.
532. **Selenko-Gebauer, N., O. Majdic, A. Szekeres, G. Höfler, E. Guthann, U. Korthäuer, G. Zlabinger, P. Steinberger, W. F. Pickl, H. Stockinger, W. Knapp, and J. Stöckl.** 2003. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *Journal of Immunology* **170**:3637-3644.
533. **Sen, G. C.** 2001. Viruses and interferons. *Annual Review of Microbiology* **55**:255-281.
534. **Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer.** 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**:59-70.
535. **Shahinian, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kundig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. S. Ohashi, C. B. Thompson, and T. W. Mak.**

1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* **261**:609-612.
536. **Sharma, S., B. R. tenOever, N. Grandvaux, G. P. Zhou, R. Lin, and J. Hiscott.** 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**:1148-1151.
537. **Sharpe, A. H., E. J. Wherry, R. Ahmed, and G. J. Freeman.** 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology* **8**:239-245.
538. **Shedlock, D. J., and H. Shen.** 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**:337-9.
539. **Shedlock, D. J., J. K. Whitmire, J. Tan, A. S. MacDonald, R. Ahmed, and H. Shen.** 2003. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Immunology* **170**:2053-2063.
540. **Sheppard, K. A., L. J. Fitz, J. M. Lee, C. Benander, J. A. George, J. Wooters, Y. Qiu, J. M. Jussif, L. L. Carter, C. R. Wood, and D. Chaudhary.** 2004. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Letters* **574**:37-41.
541. **Shi, S. T., K. J. Lee, H. Aizaki, S. B. Hwang, and M. M. Lai.** 2003. Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *Journal of Virology* **77**:4160-8.
542. **Shimizu, Y. K., S. M. Feinstone, M. Kohara, R. H. Purcell, and H. Yoshikura.** 1996. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* **23**:205-9.
543. **Shimizu, Y. K., H. Igarashi, T. Kanematu, K. Fujiwara, D. C. Wong, R. H. Purcell, and H. Yoshikura.** 1997. Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *Journal of Virology* **71**:5769-5773.
544. **Shin, H., S. D. Blackburn, J. N. Blattman, and E. J. Wherry.** 2007. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *Journal of Experimental Medicine* **204**:941-949.
545. **Shin, H., and E. J. Wherry.** 2007. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current Opinion in Immunology* **19**:408-415.
546. **Shortman, K., and Y. J. Liu.** 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Review Immunology* **2**:151-61.
547. **Shoukry, N. H., A. G. Cawthon, and C. M. Walker.** 2004. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annual Review of Microbiology* **58**:391-424.
548. **Shoukry, N. H., A. Grakoui, M. Houghton, D. Y. Chien, J. Ghayeb, K. A. Reimann, and C. M. Walker.** 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine* **197**:1645-55.
549. **Shu, S. A., Z. X. Lian, Y. H. Chuang, G. X. Yang, Y. Moritoki, S. S. Comstock, R. Q. Zhong, A. A. Ansari, Y. J. Liu, and M. E. Gershwin.** 2007. The role of CD11c(+) hepatic dendritic cells in the induction of innate immune responses. *Clinical & Experimental Immunology* **149**:335-343.

550. Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**:1835-7.
551. Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deléage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspé, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D. G. Murphy, H. Okamoto, J. M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, T. Shin-I, L. J. Stuyver, H. J. Thiel, S. Viazov, A. J. Weiner, and A. Widell. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**:962-973.
552. Smith, C. M., N. S. Wilson, J. Waithman, J. A. Villadangos, F. R. Carbone, W. R. Heath, and G. T. Belz. 2004. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nature Immunology* **5**:1143-8.
553. Smyk-Pearson, S., I. A. Tester, J. Klarquist, B. E. Palmer, J. M. Pawlotsky, L. Golden-Mason, and H. R. Rosen. 2008. Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. *Journal of Virology* **82**:1827-1837.
554. Smyk-Pearson, S., I. A. Tester, D. Lezotte, A. W. Sasaki, D. M. Lewinsohn, and H. R. Rosen. 2006. Differential antigenic hierarchy associated with spontaneous recovery from hepatitis C virus infection: implications for vaccine design. *Journal of Infectious Disease* **194**:454-463.
555. Snyder, J. T., M. A. Alexander-Miller, J. A. Berzofskyl, and I. M. Belyakov. 2003. Molecular mechanisms and biological significance of CTL avidity. *Current HIV Research* **1**:287-294.
556. Sobao, Y., H. Tomiyama, S. Nakamura, H. Sekihara, K. Tanaka, and M. Takiguchi. 2001. Visual demonstration of hepatitis C virus-specific memory CD8(+) T-cell expansion in patients with acute hepatitis C. *Hepatology* **33**:287-94.
557. Sousa, C., S. Hieny, T. Scharton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, and A. Sher. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *Journal of Experimental Medicine* **186**:1819-29.
558. Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, and A. Mantovani. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *Journal of Immunology* **161**:1083-6.
559. Sozzani, S., W. Luini, A. Borsatti, N. Polentarutti, D. Zhou, L. Piemonti, G. D'Amico, C. A. Power, T. N. Wells, M. Gobbi, P. Allavena, and A. Mantovani. 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *Journal of Immunology* **159**:1993-2000.
560. Spangenberg, H. C., S. Viazov, N. Kersting, C. Neumann-Haefelin, D. McKinney, M. Roggendorf, F. von Weizsäcker, H. E. Blum, and R. Thimme. 2005. Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **42**:828-837.

561. **Spörri, R., and C. Reis E Sousa.** 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4(+) T cell populations lacking helper function. *Nature Immunology* **6**:163-170.
562. **Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber.** 1998. How cells respond to interferons. *Annual Review in Biochemistry* **67**:227-64.
563. **Steffan, A., P. Marianneau, C. Caussin-Schwemling, C. Royer, C. Schmitt, D. Jaeck, P. Wolf, J. Gendrault, and F. Stoll-Keller.** 2001. Ultrastructural observations in hepatitis C virus-infected lymphoid cells. *Microbes Infection* **3**:193-202.
564. **Steinman, R. M., and Z. A. Cohn.** 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medecine* **137**:1142-62.
565. **Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig.** 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **21**:685-711.
566. **Steinmann, D., H. Barth, B. Gissler, P. Schurmann, M. I. Adah, J. T. Gerlach, G. R. Pape, E. Depla, D. Jacobs, G. Maertens, A. H. Patel, G. Inchauspe, T. J. Liang, H. E. Blum, and T. F. Baumert.** 2004. Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *Journal of Virology* **78**:9030-40.
567. **Stoll, S., J. Delon, T. M. Brotz, and R. N. Germain.** 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296**:1873187-6.
568. **Sugimoto, K., F. Ikeda, J. Stadanlick, F. A. Nunes, H. J. Alter, and K. M. Chang.** 2003. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* **38**:1437-48.
569. **Sumpter, R., Y. M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon, and M. Gale.** 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *Journal of Virology* **79**:2689-2699.
570. **Sun, J. C., and M. J. Bevan.** 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**:339-42.
571. **Sun, J. C., and M. J. Bevan.** 2004. Long-lived CD8 memory and protective immunity in the absence of CD40 expression on CD8 T cells. *Journal of Immunology* **172**:3385-3389.
572. **Sun, J. C., S. M. Lehar, and M. J. Bevan.** 2007. Augmented IL-7 signaling during viral infection drives greater expansion of effector T cells but does not enhance memory. *Journal of Immunology* **177**:4458-4463.
573. **Sun, J. C., M. A. Williams, and M. J. Bevan.** 2004. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nature Immunology* **5**:927-33.
574. **Sung, S. S., S. M. Fu, C. E. Rose, F. Gaskin, S. T. Ju, and S. R. Beaty.** 2006. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *Journal of Immunology* **176**:2161-2172.

575. **Sung, V. M., S. Shimodaira, A. L. Doughty, G. R. Picchio, H. Can, T. S. Yen, K. L. Lindsay, A. M. Levine, and M. M. Lai.** 2003. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *Journal of Virology* **77**:2134-46.
576. **Suzich, J. A., J. K. Tamura, F. Palmer-Hill, P. Warrener, A. Grakoui, C. M. Rice, S. M. Feinstone, and M. S. Collett.** 1993. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *Journal of Virology* **67**:6152-6158.
577. **Suzuki, N., S. Suzuki, G. S. Duncan, D. G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J. M. Penninger, H. Wesche, P. S. Ohashi, T. W. Mak, and W. C. Yeh.** 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Journal of Virology* **416**:750-756.
578. **Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler.** 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:3516-3521.
579. **Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D. A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein, and B. Beutler.** 2006. The Unc93bl mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature Immunology* **7**:156-164.
580. **Tacke, F., F. Ginhoux, C. Jakubzick, N. van Rooijen, M. Merad, and G. J. Randolph.** 2006. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *Journal of Experimental Medicine* **203**:583-597.
581. **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. *Nature Medicine* **6**:578-82.
582. **Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira.** 2003. Toll-like receptors. *Annual Reviews in Immunology* **21**:335-76.
583. **Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira.** 2003. Toll-like receptors. *Annual Review Immunology* **21**:335-376.
584. **Takemoto, N., A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry, and S. L. Reiner.** 2006. IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation. *Journal of Immunology* **177**:7515-7519.
585. **Taraban, V. Y., T. F. Rowley, D. F. Tough, and A. Al-Shamkhani.** 2006. Requirement for CD70 in CD4⁺ Th cell-dependent and innate receptor-mediated CD8⁺ T cell priming. *Journal of Immunology* **177**:2969-2975.
586. **Tassaneeritthep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumppheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L.**

- Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich.** 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **197**:823-9.
587. **Tavakoli, S., I. Mederacke, S. Herzog-Hauff, D. Glebe, S. Grün, D. Strand, S. Urban, A. Gehring, P. R. Galle, and W. O. Böcher.** 2008. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clinical & Experimental Immunology* **151**:61-70.
588. **Tester, I., S. Smyk-Pearson, P. Wang, A. Wertheimer, E. Yao, D. M. Lewinsohn, J. E. Tavis, and H. R. Rosen.** 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *Journal of Experimental Medicine* **201**:1725-1731.
589. **Thery, C., and S. Amigorena.** 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinions in Immunology* **13**:45-51.
590. **Thimme, R., J. Bukh, H. C. Spangenberg, S. Wieland, J. Pemberton, C. Steiger, S. Govindarajan, R. H. Purcell, and F. V. Chisari.** 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**:15661-8.
591. **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. *Journal of Experimental Medicine* **194**:1395-406.
592. **Thio, C. L., X. Gao, J. J. Goedert, D. Vlahov, K. E. Nelson, M. W. Hilgartner, S. J. O'Brien, P. Karacki, J. Astemborski, M. Carrington, and D. L. Thomas.** 2002. HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *Journal of Virology* **76**:4792-7.
593. **Thompson, K. C., A. Trowern, A. Fowell, M. Marathe, C. Haycock, M. J. Arthur, and N. Sheron.** 1998. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation *In vitro*. *Hepatology* **28**:1518-1524.
594. **Thursz, M., R. Yallop, R. Goldin, C. Trepo, and H. C. Thomas.** 1999. 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**:2119-24.
595. **Timm, J., G. M. Lauer, D. G. Kavanagh, I. Sheridan, A. Y. Kim, M. Lucas, T. Pillay, K. Ouchi, L. L. Reyor, J. S. Zur Wiesch, R. T. Gandhi, R. T. Chung, N. Bhardwaj, P. Klenerman, B. D. Walker, and T. M. Allen.** 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *Journal of Experimental Medicine* **200**:1593-604.
596. **Timpe, J. M., Z. Stamataki, A. Jennings, K. Hu, M. J. Farquhar, H. J. Harris, A. Schwarz, I. Desombere, G. L. Roels, P. Balfe, and J. A. McKeating.** 2007. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**:17-24.
597. **Torresi, J., M. Bharadwaj, D. C. Jackson, and E. J. Gowans.** 2004. Neutralising antibody, CTL and dendritic cell responses to hepatitis C virus: a preventative vaccine strategy. *Current Drug Targets* **5**:41-56.

598. **Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly.** 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* **12**:1198-1202.
599. **Tscherne, D. M., C. T. Jones, M. J. Evans, B. D. Lindenbach, J. A. McKeating, and C. M. Rice.** 2006. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of Virology* **80**:1734-1741.
600. **Tsubouchi, E., S. M. Akbar, N. Horiike, and M. Onji.** 2004. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Gastroenterology* **39**:754-62.
601. **Tsubouchi, E., S. M. Akbar, H. Murakami, N. Horiike, and M. Onji.** 2004. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Journal of Clinical Experimental Immunology* **137**:417-23.
602. **Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto.** 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* **66**:1476-83.
603. **Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman.** 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* **288**:522-7.
604. **Uematsu, S., S. Sato, M. Yamamoto, T. Hirotani, H. Kato, F. Takeshita, M. Matsuda, C. Coban, K. J. Ishii, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2005. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *Journal of Experimental Medicine* **201**:915-923.
605. **Ulsenheimer, A., J. T. Gerlach, N. H. Gruener, M. C. Jung, C. A. Schirren, W. Schraut, R. Zachoval, G. R. Pape, and H. M. Diepolder.** 2003. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* **37**:1189-98.
606. **Untergasser, A., U. Zedler, A. Langenkamp, M. Hösel, M. Quasdorff, K. Esser, H. P. Dienes, B. Tappertzhofen, W. Kolanus, and U. Protzer.** 2006. Dendritic cells take up viral antigens but do not support the early steps of hepatitis B virus infection. *Hepatology* **43**:539-547.
607. **Urbani, A., G. Biasiol, M. Brunetti, C. Volpari, S. Di Marco, M. Sollazzo, S. Orrù, F. D. Piaz, A. Casbarra, P. Pucci, C. Nardi, P. Gallinari, R. De Francesco, and C. Steinkühler.** 1999. Multiple determinants influence complex formation of the hepatitis C virus NS3 protease domain with its NS4A cofactor peptide. *Biochemistry* **38**:5206-5215.
608. **Urbani, S., B. Amadei, E. Cariani, P. Fiscaro, A. Orlandini, G. Missale, and C. Ferrari.** 2005. The impairment of CD8 responses limits the selection of escape mutations in acute hepatitis C virus infection. *175*:7519-7529.
609. **Urbani, S., B. Amadei, P. Fiscaro, D. Tola, A. Orlandini, L. Sacchelli, C. Mori, G. Missale, and C. Ferrari.** 2006. Outcome of acute hepatitis C is

- related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. **44**:126-139.
610. **Urbani, S., B. Amadei, D. Tola, M. Massari, S. Schivazappa, G. Missale, and C. Ferrari.** 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *Journal of Virology* **80**:11398-11403.
611. **Urbani, S., B. Amadei, D. Tola, G. Pedrazzi, L. Sacchelli, M. C. Cavallo, A. Orlandini, G. Missale, and C. Ferrari.** 2008. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: Effect of viremia levels and antiviral treatment. *Journal of Hepatology* doi:10.1016/j.jhep.2007.12.014.
612. **Urbani, S., C. Boni, G. Missale, G. Elia, C. Cavallo, M. Massari, G. Raimondo, and C. Ferrari.** 2002. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *Journal of Virology* **76**:12423-34.
613. **Vaccari, M., C. J. Trindade, D. Venzon, M. Zanetti, and G. Franchini.** 2005. Vaccine-induced CD8+ central memory T cells in protection from simian AIDS. *Journal of Immunology* **175**:3502-3507.
614. **Valenzuela, J., C. Schmidt, and M. Mescher.** 2002. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. *Journal of Immunology* **169**:6842-9.
615. **Valenzuela, J. O., C. D. Hammerbeck, and M. F. Mescher.** 2005. Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *Journal of Immunology* **174**:600-604.
616. **Van Compernelle, S. E., S. Levy, and S. C. Todd.** 2001. Anti-CD81 activates LFA-1 on T cells and promotes T cell-B cell collaboration. *European Journal of Immunology* **31**:823-31.
617. **Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari, and C. Caux.** 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *European Journal of Immunology* **32**:231-42.
618. **Velu, V., S. Kannanganat, C. Ibegbu, L. Chennareddi, F. Villinger, G. J. Freeman, R. Ahmed, and R. R. Amara.** 2007. Elevated expression levels of inhibitory receptor programmed death 1 on simian immunodeficiency virus-specific CD8 T cells during chronic infection but not after vaccination. *Journal of Virology* **81**:5819-5828.
619. **von Hahn, T., and C. M. Rice.** 2008. Hepatitis C virus entry. *Journal of Biological Chemistry* **283**:3689-3693.
620. **von Hahn, T., J. C. Yoon, H. Alter, C. M. Rice, B. Rehmann, P. Balfe, and J. A. McKeating.** 2007. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* **132**:667-678.
621. **Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang.** 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **11**:791-796.

622. **Wang, B., R. Maile, R. Greenwood, E. J. Collins, and J. A. Frelinger.** 2000. Naive CD8⁺ T cells do not require costimulation for proliferation and differentiation into cytotoxic effector cells. *Journal of Immunology* **164**:1216-1222.
623. **Warger, T., P. Osterloh, G. Rechtsteiner, M. Fassbender, V. Heib, B. Schmid, E. Schmitt, H. Schild, and M. P. Radsak.** 2006. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood* **108**:544-550.
624. **Washenberger, C. L., J. Q. Han, K. J. Kechris, B. K. Jha, R. H. Silverman, and D. J. Barton.** 2007. Hepatitis C virus RNA: Dinucleotide frequencies and cleavage by RNase L. *Virus Research* **130**:85-95.
625. **Wedemeyer, H., X. S. He, M. Nascimbeni, A. R. Davis, H. B. Greenberg, J. H. Hoofnagle, T. J. Liang, H. Alter, and B. Rehermann.** 2002. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Immunology* **169**:3447-58.
626. **Weighardt, H., G. Jusek, J. Mages, R. Lang, K. Hoebe, B. Beutler, and B. Holzmann.** 2004. Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells. *European Journal of Immunology* **34**:558-564.
627. **Weiner, A., A. L. Erickson, J. Kansopon, K. Crawford, E. Muchmore, A. L. Hughes, M. Houghton, and C. M. Walker.** 1995. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**:2755-9.
628. **Weiner, A. J., X. Paliard, M. J. Selby, A. Medina-Selby, D. Coit, S. Nguyen, J. Kansopon, C. L. Arian, P. Ng, J. Tucker, C. T. Lee, N. K. Polakos, J. Han, S. Wong, H. H. Lu, S. Rosenberg, K. M. Brasky, D. Chien, G. Kuo, and M. Houghton.** 2001. Intrahepatic genetic inoculation of hepatitis C virus RNA confers cross-protective immunity. *Journal of Virology* **75**:7142-8.
629. **Weston, S. J., R. L. Leistikow, K. R. Reddy, M. Torres, A. M. Wertheimer, D. M. Lewinsohn, S. Chou, M. P. Davey, C. Corless, C. O'Farrelly, D. R. Nelson, and H. R. Rosen.** 2005. Reconstitution of hepatitis C virus-specific T-cell-mediated immunity after liver transplantation. *Hepatology* **41**:72-81.
630. **Wherry, E. J., and R. Ahmed.** 2004. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *Journal of Virology* **78**:5535-5545.
631. **Wherry, E. J., D. L. Barber, S. M. Kaech, J. N. Blattman, and R. Ahmed.** 2004. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:16004-16009.
632. **Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most, and R. Ahmed.** 2003. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of Virology* **77**:4911-4927.
633. **Wherry, E. J., S. J. Ha, S. M. Kaech, W. N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. N. Blattman, D. L. Barber, and R. Ahmed.** 2007.

- Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**:670-684.
634. **Wherry, E. J., V. Teichgräber, T. C. Becker, D. Masopust, S. M. Kaech, R. Antia, U. H. von Andrian, and R. Ahmed.** 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology* **4**:225-234.
635. **Wiegard, C., P. Wolint, C. Frenzel, U. Cheruti, E. Schmitt, A. Oxenius, A. W. Lohse, and J. Herkel.** 2007. Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance. *Gastroenterology* **133**:2010-2018.
636. **Wieland, S., R. Thimme, R. H. Purcell, and F. V. Chisari.** 2004. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**:6669-6674.
637. **Willberg, C., E. Barnes, and P. Klenerman.** 2003. HCV immunology--death and the maiden T cell. *Cell Death Differentiation* **10**:S39-47.
638. **Wille-Reece, U., B. J. Flynn, K. Loré, R. A. Koup, R. M. Kedl, J. J. Mattapallil, W. R. Weiss, M. Roederer, and R. A. Seder.** 2005. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8⁺ T cell responses in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102**:15190-15194.
639. **Wille-Reece, U., B. J. Flynn, K. Loré, R. A. Koup, A. P. Miles, A. Saul, R. M. Kedl, J. J. Mattapallil, W. R. Weiss, M. Roederer, and R. A. Seder.** 2006. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *Journal of Experimental Medicine* **203**:1249-1258.
640. **Wille-Reece, U., C. Y. Wu, B. J. Flynn, R. M. Kedl, and R. A. Seder.** 2005. Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8⁺ T cell responses. *Journal of Immunology* **174**:7676-7683.
641. **Williams, M. A., and M. J. Bevan.** 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annual Review Immunology* **25**:171-192.
642. **Williams, M. A., and M. J. Bevan.** 2006. Immunology: exhausted T cells perk up. *Nature* **439**:669-670.
643. **Williams, M. A., A. J. Tyznik, and M. J. Bevan.** 2006. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* **441**:890-893.
644. **Wilson, N. S., G. M. Behrens, R. J. Lundie, C. M. Smith, J. Waithman, L. Young, S. P. Forehan, A. Mount, R. J. Steptoe, K. D. Shortman, T. F. de Koning-Ward, G. T. Belz, F. R. Carbone, B. S. Crabb, W. R. Heath, and J. A. Villadangos.** 2006. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nature Immunology* **7**:165-172.
645. **Witherden, D. A., R. Boismenu, and W. L. Havran.** 2000. CD81 and CD28 costimulate T cells through distinct pathways. *Journal of Immunology* **165**:1902-9.
646. **Wölk, B., D. Sansonno, H. G. Kräusslich, F. Dammacco, C. M. Rice, H. E. Blum, and D. Moradpour.** 2000. Subcellular localization, stability, and

- trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology* **74**:2293-2304.
647. **Wong, D. K., D. D. Dudley, P. B. Dohrenwend, G. M. Lauer, R. T. Chung, D. L. Thomas, and B. D. Walker.** 2001. Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *Journal of Virology* **75**:1229-35.
648. **Wu, S. J., G. Grouard-Vogel, W. Sun, J. R. Mascola, E. Brachtel, R. Putvatana, M. K. Louder, L. Filgueira, M. A. Marovich, H. K. Wong, A. Blauvelt, G. S. Murphy, M. L. Robb, B. L. Innes, D. L. Birx, C. G. Hayes, and S. S. Frankel.** 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine* **6**:816-20.
649. **Wuensch, S. A., R. H. Pierce, and I. N. Crispe.** 2006. Local intrahepatic CD8+ T cell activation by a non-self-antigen results in full functional differentiation. *Journal of Immunology* **177**:1689-1697.
650. **Xu, Z., J. Choi, W. Lu, and J. H. Ou.** 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **77**:1578-83.
651. **Xu, Z., J. Choi, T. S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M. J. Selby, and J. Ou.** 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO Journal* **20**:3840-8.
652. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**:640-3.
653. **Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira.** 2002. A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology* **169**:6668-6672.
654. **Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma, and H. Yagita.** 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of Immunology* **169**:5538-5545.
655. **Yang, K., A. Puel, S. Zhang, C. Eidenschenk, C. L. Ku, A. Casrouge, C. Picard, H. von Bernuth, B. Senechal, S. Plancoulaine, S. Al-Hajjar, A. Al-Ghonaum, L. Maródi, D. Davidson, D. Speert, C. Roifman, B. Z. Garty, A. Ozinsky, F. J. Barrat, R. L. Coffman, R. L. Miller, X. Li, P. Lebon, C. Rodriguez-Gallego, H. Chapel, F. Geissmann, E. Jouanguy, and J. L. Casanova.** 2005. Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity* **23**:465-478.
656. **Yang, Y., C. T. Huang, X. Huang, and D. M. Pardoll.** 2004. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nature Immunology* **5**:508-15.

657. **Yarovinsky, F., H. Kanzler, S. Hieny, R. L. Coffman, and A. Sher.** 2006. Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response. *Immunity* **25**:655-664.
658. **Yin, H., L. Cheng, R. Langenbach, and C. Ju.** 2007. Prostaglandin I(2) and E(2) mediate the protective effects of cyclooxygenase-2 in a mouse model of immune-mediated liver injury. *Hepatology* **45**:159-169.
659. **Yoneyama, H., K. Matsuno, Y. Zhang, M. Murai, M. Itakura, S. Ishikawa, G. Hasegawa, M. Naito, H. Asakura, and K. Matsushima.** 2001. Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *Journal of Experimental Medicine* **193**:35-49.
660. **Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita.** 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral response. *Nature Immunology* **5**:730-737.
661. **You, S., D. D. Stump, A. D. Branch, and C. M. Rice.** 2004. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* **78**:1352-1366.
662. **Young, L. J., N. S. Wilson, P. Schnorrer, A. Mount, R. J. Lundie, N. L. La Gruta, B. S. Crabb, G. T. Belz, W. R. Heath, and J. A. Villadangos.** 2007. Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**:17753-17758.
663. **Zajac, A. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, D. J. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman, and R. Ahmed.** 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *Journal of Experimental Medicine* **188**:2205-13.
664. **Zehender, G., L. Meroni, C. De Maddalena, S. Varchetta, G. Monti, and M. Galli.** 1997. Detection of hepatitis C virus RNA in CD19 peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *Journal of Infectious Disease* **76**:1209-14.
665. **Zeisel, M. B., G. Koutsoudakis, E. K. Schnober, A. Haberstroh, H. E. Blum, F. L. Cosset, T. Wakita, D. Jaeck, M. Doffoel, C. Royer, E. Soulier, E. Schvoerer, C. Schuster, F. Stoll-Keller, R. Bartenschlager, T. Pietschmann, H. Barth, and T. F. Baumert.** 2007. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**:1722-1731.
666. **Zhang, J. Y., Z. Zhang, X. Wang, J. L. Fu, J. Yao, Y. Jiao, L. Chen, H. Zhang, J. Wei, L. Jin, M. Shi, G. F. Gao, H. Wu, and F. S. Wang.** 2007. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* **109**:4671-8.
667. **Zhang, P., C. G. Wu, K. Mihalik, M. L. Virata-Theimer, M. Y. Yu, H. J. Alter, and S. M. Feinstone.** 2007. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**:8449-8454.

668. **Zhang, S., V. A. Lawless, and M. H. Kaplan.** 2000. Cytokine-stimulated T lymphocyte proliferation is regulated by p27Kip1. *Journal of Immunology* **165**:6270-7.
669. **Zhang, X., J. C. Schwartz, X. Guo, S. Bhatia, E. Cao, M. Lorenz, M. Cammer, L. Chen, Z. Y. Zhang, M. A. Edidin, S. G. Nathenson, and S. C. Almo.** 2004. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity* **20**:337-347.
670. **Zheng, A., F. Yuan, Y. Li, F. Zhu, P. Hou, J. Li, X. Song, M. Ding, and H. Deng.** 2007. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *Journal of Virology* **81**:12465-12471.
671. **Zhong, X., C. Bai, W. Gao, T. B. Strom, and T. L. Rothstein.** 2004. Suppression of expression and function of negative immune regulator PD-1 by certain pattern recognition and cytokine receptor signals associated with immune system danger. *International Immunology* **16**:1181-1188.
672. **Zhu, F., and D. D. Eckels.** 2002. Functionally distinct helper T-cell epitopes of HCV and their role in modulation of NS3-specific, CD8+/tetramer positive CTL. *Human Immunology* **63**:710-8.
673. **Zimmerli, S. C., and C. Hauser.** 2007. Langerhans cells and lymph node dendritic cells express the tight junction component claudin-1. *Journal of Investigative Dermatology* **127**:2381-2390.
674. **Zitron, I. M., M. Laurinaitis, L. Qu, A. L. Silverman, and S. C. Gordon.** 2000. Immunological responses in patients who have spontaneously eradicated hepatitis C virus infection. *Viral Immunology* **13**:521-31.

ANNEXE

Tableau 9. Paramètres cliniques des patients étudiés en supplémentaires.

Patient (n=27)	Age/Sexe	Genotype	Virémie ^a (IU/ml)	ARN VHC ^b	
				Naive ^f	PHA/IL-2 ^c
P01	48/M	1a	3 900 000	+	+
P03	21/M	1a	251 000	+	+
P04	52/M	3a	2 910 000	+	-
P06	42/M	1a	216 000	+	+
P07	27/M	3a	17 800	+	+
P08	42/F	1a	2 960 000	+	+
P09	53/M	3a	2 910 000	+	-
P11	45/M	3a	906 000	+	N/A
P12	33/M	3a	1 470 000	+	N/A
P13	46/M	3a	1 200 000	+	-
P15	26/M	1b	790 000	+	-
P18	24/M	1a	284 000	+	N/A
P19	39/M	1a	90 300	+	N/A
P20	30/M	1a	1 400 000	+	N/A
P23	52/F	1	348 000	+	N/A
P24	50/M	1	5 495 409	-	+
P25	20/M	1	1 148 154	-	+
P26	47/M	1	2 884 032	+	+
P28	46/M	1b	4 940 000	+	N/A
P29	59/F	1	2 880 000	+	N/A
P30	49/M	1	809 000	+	N/A
P31	49/M	1	≤ 50	+	N/A
P32	43/F	1	3 690 000	+	N/A
P33	33/F	1	3 410 000	+	+
P34	74/M	1	282 000	+	+
P35	49/M	1	≤ 50	-	+
P37	48/M	1	N/A	+	-
				24/27 (89%)	12/16 (75%)

Abbreviations: N/A, donnée non disponible.

^aMesuré avec Cobas Amplicor HCV Monitor Test v2.0.

^bMesuré par un RT-PCR quantitatif avec des sondes d'hybridisation sur un instrument LightCycler: +, détecté; -, en-dessous du seuil de détection (<100 copies x10⁻⁶ PBMC).

^cPBMC CD14-déplété stimulé avec 3 µg/ml de PHA & 200 U/ml d'IL-2 pour 3-7 jours.

^fNaive réfère au fait qu'il s'agit de PBMC totaux sans stimulation mitogénique.

Figure 21. *Interaction spécifique entre le VHC et les cellules du système immunitaire.* Cinétique d'accumulation et persistance du VHC dans les PBMC CD14⁻ (PBL) activés. Les ARN extraits de PBL stimulés avec 3µg mL⁻¹ de phytohemagglutinine (PHA) et 200 U mL⁻¹ d'IL-2 ont été analysés par RT-PCR sur un instrument LightCycler pour quantifier le nombre de molécules du génome viral détectables après stimulation. Les données sont exprimées en nombre de molécules d'ARN du VHC pour 10⁶ cellules. Six patients représentatifs de 16 sont montrés (voir Tableau 9).

