

Université de Montréal

**Définition des interactions entre l'immunité innée et adaptative
pendant l'infection aiguë par le virus de l'hépatite C (VHC)**

par

Sandy Pelletier

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D. en Microbiologie et Immunologie

Janvier 2013

© Sandy Pelletier, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Définition des interactions entre l'immunité innée et adaptative pendant l'infection aiguë par le virus de
l'hépatite C (VHC)

présentée par :
Sandy Pelletier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Daniel Lamarre, président-rapporteur
Dre Naglaa Shoukry, directrice de recherche
Dr Michel Roger, membre du jury
Dr Georg Lauer, examinateur externe
Dr Martin Guimond, représentant du doyen de la FES

Résumé

La majorité des individus exposés au virus de l'hépatite C (VHC) développent une infection chronique. Une réponse immunitaire adaptative forte et soutenue est associée avec la guérison spontanée du VHC, mais les mécanismes sous-jacents demeurent mal définis.

Le rôle des cellules NK et des cellules dendritiques (DC) dans la guérison spontanée du VHC est encore méconnu. Les cellules NK sont la population effectrice la plus importante de l'immunité innée car elles tuent les cellules infectées et sécrètent diverses cytokines. Les DC reconnaissent des agents infectieux et elles sont les premières à initier et réguler l'immunité adaptative. Les cellules NK et les DC interagissent également entre elles afin de réguler l'immunité innée et adaptative.

L'hypothèse du projet de doctorat est que l'activité des cellules NK pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC module la fonction des DC afin que ces dernières puissent générer une réponse immunitaire adaptative capable d'éliminer le VHC.

Le premier objectif était d'établir une corrélation entre l'activité des cellules NK et l'évolution de l'infection au VHC. Nous avons observé une augmentation de la cytotoxicité, mais une diminution de la sécrétion de cytokines par les cellules NK chez les patients chroniques et qui ont résolu spontanément pendant la phase aiguë en comparaison aux contrôles non infectés, démontrant alors une dissociation entre ces deux fonctions. Nos résultats suggèrent que les cellules NK sont activées pendant la phase aiguë indépendamment de l'évolution de l'infection.

Le deuxième objectif était d'établir une corrélation entre le phénotype et la fonction des DC, et l'évolution de l'infection. Nous avons d'abord observé que les DC plasmacytoïdes de tous les patients infectés ont un phénotype plus immature que les contrôles, et que ce phénotype est plus prononcé chez les patients ayant résolu spontanément. De plus, en réponse à des stimulations, nous avons observé que pendant la phase aiguë précoce, les DC myéloïdes (mDC) de tous les patients infectés indépendamment

de l'évolution de l'infection produisent davantage de cytokines en comparaison aux contrôles. Cependant, cette hyperréactivité n'est pas soutenue au cours de l'évolution chronique.

Le troisième objectif était d'établir une corrélation entre les interactions NK/DC et l'évolution de l'infection. Nous avons étudié la capacité des cellules NK à lyser les DC potentiellement tolérogéniques, ainsi que la capacité des DC matures à activer les cellules NK, et nous avons observé aucune différence entre les patients infectés et les contrôles. Finalement, nous avons démontré pour la première fois la capacité des DC immatures à inhiber la fonction des cellules NK.

En conclusion, nous avons démontré que les cellules NK sont activées pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC indépendamment de l'évolution de l'infection. De plus, la capacité des cellules NK à éliminer les DC potentiellement tolérogéniques est intacte. Finalement, les mDC sont hyperréactives pendant la phase aiguë de l'infection, mais cette hyperréactivité n'est pas soutenue avec la persistance de l'infection. Cette perte d'hyperréactivité des mDC ne semble pas affecter la capacité des DC à activer les cellules NK, mais elle pourrait jouer un rôle dans l'inefficacité de l'immunité adaptative à éliminer le VHC.

Mots-clés :

Virus de l'hépatite C (VHC)

Résolution spontanée du VHC

Infection aiguë par le VHC

Immunité innée

Cellules NK

Cellules dendritiques (DC)

Interactions NK/DC

Hyperréactivité des DC

Abstract

The majority of individuals exposed to the hepatitis C virus (HCV) develop a chronic infection. It is known that a strong and sustained adaptive immune response is associated with the spontaneous clearance of HCV, however the underlying mechanisms are not well defined.

The role of natural killer (NK) cells and dendritic cells (DCs) during the spontaneous resolution of HCV remains unknown. NK cells are the primary effector population of the innate immune response which are able to kill infected cells and secrete various cytokines. On the other hand, DCs are the first cell type to initiate and regulate adaptive immunity after recognizing infectious pathogens. NK cells and DCs can also interact reciprocally to further regulate innate and adaptive immunity.

Our hypothesis is that NK cell activity during acute HCV will modulate DC function to prime a highly efficient adaptive immune response resulting in viral clearance.

The first aim of my project was to establish a correlation between NK cell activity and the outcome of HCV infection. We observed increased NK cell cytotoxicity, but decreased cytokine secretion during acute HCV in patients with chronic evolution as well as spontaneous resolution, further demonstrating a dissociation between these two NK cell functions. Our results suggest that NK cells are activated during acute HCV infection regardless of infection outcome.

The second aim was to establish a correlation between DC phenotype, function and the outcome of infection. We observed that plasmacytoid DCs (pDCs) from all HCV-infected patients have a more immature phenotype as compared to negative controls, yet this is more pronounced in spontaneous resolvers. Furthermore, we observed that during the early acute phase, myeloid DCs (mDCs) from all HCV-infected patients, regardless of outcome, have increased production of cytokines as compared to un-infected controls in response to stimulation. However, this hyperresponsiveness of mDCs is not sustained with chronic evolution.

The third aim was to establish a correlation between the NK/DC cross-talk and infection outcome. We studied the capacity of NK cells to kill potentially tolerogenic DCs, as well as the capacity of mature DCs to activate NK cells, and we observed no major differences between different stages of HCV infection and un-infected controls. However, we obtained unprecedented data which suggests that immature DCs have the capacity to inhibit NK cell function.

In conclusion, our results demonstrate that NK cells are activated during acute HCV infection regardless of its outcome. Furthermore, the capacity of NK cells to kill potentially tolerogenic DCs is intact for all groups of patients. Finally, mDCs are hyperresponsive during acute HCV, but this hyperresponsiveness is not sustained with persistence of viremia. The loss of mDC hyperresponsiveness does not seem to affect the capacity of DCs to activate NK cells, but might play a role in the capacity of DCs to prime a highly efficient adaptive immune response resulting in viral clearance.

Keywords :

Hepatitis C virus (HCV)

HCV spontaneous resolution

Acute HCV

Innate immunity

NK cells

Dendritic cells (DC)

NK/DC cross-talk

DC hyperresponsiveness

Table des matières

Pages liminaires

Résumé.....	iii
Mots-clés :.....	iv
Abstract.....	v
Keywords :.....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvii
SECTION 1 : INTRODUCTION	1
1.1 L'infection par le virus de l'hépatite C.....	1
1.1.1 Épidémiologie.....	1
1.1.2 Évolution de l'infection par le VHC.....	3
1.1.3 Le traitement contre l'infection par le VHC.....	5
1.1.4 Le virus.....	7
1.2 Le système immunitaire.....	9
1.2.1 Les cellules NK.....	9
1.2.1.1 Les sous-populations de cellules NK.....	9
1.2.1.2 Les récepteurs inhibiteurs et activateurs de cellules NK.....	9
1.2.1.3 Production de cytokines par les cellules NK.....	13
1.2.1.4 Cytotoxicité des cellules NK.....	13
1.2.2 Les cellules dendritiques.....	19
1.2.3 Les interactions NK/DC.....	22
1.2.3.1 Les lieux potentiels d'interactions NK/DC.....	24
1.2.3.2 Les cellules NK induisent la maturation des DC.....	24

1.2.3.3 Les cellules NK lysent les DC	25
1.2.3.4 Les DC activent les cellules NK	26
1.2.4 La réponse immunitaire à médiation cellulaire lors d'une infection par un pathogène	26
1.3 Le rôle des cellules NK et des DC dans le contrôle d'infections virales	30
1.4 La réponse immunitaire au VHC	32
1.4.1 Les cellules NK	32
1.4.1.1 Études génétiques	32
1.4.1.2 Les interactions entre les cellules NK et le VHC	35
1.4.1.3 Études précédentes sur les cellules NK de patients infectés par le VHC	36
1.4.2 Études précédentes sur les DC de patients infectés par le VHC	37
1.5 L'immunité adaptative contre le VHC	38
SECTION 2 : HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	42
SECTION 3: MANUSCRIT 1	45
Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses	45
Abstract	47
Abbreviations	48
Introduction	49
Patients and methods	51
Results	56
Discussion	61
Figures and Table	67
References	83
SECTION 4 : MANUSCRIT 2	86
Sustained Hyperresponsiveness of Dendritic Cells is Associated with Spontaneous Resolution of Acute Hepatitis C	86
Abbreviations	87
Abstract	88

Introduction.....	89
Patients and Methods	91
Results.....	95
Discussion.....	100
Table and figures.....	105
References.....	115
SECTION 5: MANUSCRIT 3	119
Cross-Talk between Natural Killer and Dendritic Cells is Intact during Acute and Chronic HCV Infection	119
Abbreviations.....	120
Abstract.....	121
Introduction.....	122
Patients and Methods	125
Results.....	129
Discussion.....	134
Table and figures.....	138
References.....	149
SECTION 6 : CONCLUSION.....	153
6.1 Étape #1 Capacité des DC à moduler les cellules NK.....	155
6.1.1 Sommaire des résultats	155
6.1.2 Conclusion et perspectives.....	156
6.2 Étape #2 Capacité des cellules NK à lyser des cellules cibles.....	157
6.2.1 Sommaire des résultats	157
6.2.2 Conclusion et perspectives.....	158
6.3 Étape #3 Capacité des cellules NK à promouvoir la réponse Th1	160
6.3.1 Sommaire des résultats	160
6.3.2 Conclusion et perspectives.....	162
6.4 Étape #4 La capacité des cellules NK à lyser les DC immatures	164

6.4.1 Sommaire des résultats	164
6.4.2 Conclusion et perspectives.....	164
6.5 Étape #5 La capacité des DC à induire des lymphocytes T effecteurs	165
6.5.1 Sommaire des résultats	165
6.5.2 Conclusions et perspectives	167
6.6 Autres facteurs pouvant potentiellement moduler la réponse immunitaire spécifique pour le VHC	171
6.6.1 Activation de lymphocytes T CD8 ⁺ par des cellules autres que les DC	171
6.6.2 Mutations du VHC permettant d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T.....	172
6.6.3 Développement de lymphocytes T dysfonctionnels	173
6.6.4 L'absence d'aide provenant des lymphocytes T CD4 ⁺	174
6.6.5 Suppression par les lymphocytes T régulateurs.....	174
6.7 Modèle proposé.....	175
6.8 Perspectives.....	178
6.8.1 Déterminer l'impact de l'hyperréactivité des DC sur l'immunité adaptative.....	178
6.8.2 Déterminer la cause de l'hyperréactivité des DC	178
6.8.3 Étude des cellules NK et des DC infiltrant le foie et les organes lymphoïdes secondaires pendant la phase aiguë du VHC.....	179
6.8.4 Étude des DC entrées en contact avec le VHC	180
6.8.5 Établir un lien fonctionnel entre la génétique et l'évolution de l'infection par le VHC.....	181
6.8.6 Utilisation des cellules NK dans le traitement contre le VHC.....	181
6.8.7 Les besoins d'un vaccin prophylactique	183
Bibliographie.....	185
CURRICULUM VITAE.....	xix

Liste des tableaux

Table I ^{m1} : Demographics and Characteristics of patients and donors.	67
Table I ^{m2} : Demographics and Characteristics of patients and donors.	105
Table I ^{m3} : Demographics and Characteristics of patients and donors.	138

Liste des figures

SECTION 1 : INTRODUCTION

Figure 1: Prévalence mondiale de l'infection par le VHC.	2
Figure 2 : Évolution de l'infection par le VHC.	4
Figure 3 : Les protéines structurales et non structurales du VHC.	8
Figure 4 : Les récepteurs inhibiteurs et activateurs de cellules NK et leurs ligands.	12
Figure 5 : Fonctions des cellules NK.....	14
Figure 6 : Régulation de la lyse de cellules cibles par les cellules NK	18
Figure 7 : Présentation de peptides antigéniques aux lymphocytes T par les DC.	21
Figure 8 : Les interactions NK/DC.....	23
Figure 9 : Différentiation de lymphocytes T naïfs en différentes sous-populations de cellules effectrices.	29
Figure 10: Les effets de l'interaction entre les KIR2DL et leurs ligands HLA-C sur le niveau d'activation des cellules NK.	34
Figure 11: La réponse immunitaire adaptative pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC.	39
SECTION 3: MANUSCRIT 1	45
Figure 1 ^{ml} : No change in frequency of CD56 ^{dim} CD16 ⁺ NK cells following HCV exposure.....	68
Figure 2 ^{ml} : Acute HCV infection is associated with increased NK cell degranulation regardless of infection outcome.....	69
Figure 3 ^{ml} : HCV infection is associated with decreased IFN- γ regardless of infectious outcome.	71
Figure 4 ^{ml} : Expression of activation markers, activating receptors and inhibitory receptors by NK cells.	72
Figure 5 ^{ml} : NK cell peak precedes or coincides with peak HCV-specific T cell responses.	73
Figure 6 ^{ml} : NK cell degranulation correlates positively but IFN- γ correlates negatively with HCV- specific T cell adaptive immune response.	76
Supplementary Figure 1 ^{ml} : Representative flow cytometry staining for CD107a and IFN- γ	77

Supplementary Figure 2 ^{m1} : Total CD107a expression and total IFN- γ production.....	78
Supplementary Figure 3 ^{m1} : Representative flow cytometry staining for inhibitory receptors.	79
Supplementary Figure 4 ^{m1} : Representative flow cytometry staining for activation markers and activating receptors.....	80
Supplementary Figure 5 ^{m1} : Total CD107a expression and total IFN- γ production do not correlate with HCV-specific T cell responses.....	81
SECTION 4 : MANUSCRIT 2.....	86
Figure 1 ^{m2} : Decreased pDC frequency during acute HCV with chronic evolution.	106
Figure 2 ^{m2} : mDC immature phenotype is associated with evolution of infection irrespective of outcome.	108
Figure 3 ^{m2} : pDC immature phenotype is associated with spontaneous resolution.	109
Figure 4 ^{m2} : Increased cytokine production in response to TLR4 ligand is associated with spontaneous resolution.....	111
Figure 5 ^{m2} : Increased cytokine production in response to TLR7/8 ligand is associated with spontaneous resolution.....	113
Figure 6 ^{m2} : Figure 6. Viral load correlates with increased mDC antigen uptake.....	114
SECTION 5: MANUSCRIT 3.....	119
Figure 1 ^{m3} : NK cell-mediated killing of DCs is intact during different stages of HCV infection.	140
Figure 2 ^{m3} : Differential regulation of rNK cells by mDCs and iDCs.	142
Figure 3 ^{m3} : Immature DC-induced inhibition of NK cell function is intact during HCV infection.	144
Figure 4 ^{m3} : Mature DC-induced activation of NK cell function is intact during HCV infection.	146
Figure 5 ^{m3} : Reciprocal NK/DC cross-talk is intact during HCV infection.	148
SECTION 6 : CONCLUSION.....	153
Figure 12: Les interactions entre les cellules NK, les DC et les lymphocytes T.....	154
Figure 13 : Expérience future.	170
Figure 14: Modèle proposé.	177

Liste des abréviations

ADCC, cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

ALT, alanine aminotransférase

APC, cellules présentatrices d'antigènes

BAT3, *HLA-B-associated transcript 3*

BDCA, *blood DC antigen*

CCR, *chemokine (C-C motif) receptor*

CCL, *chemokine (C-C motif) ligand*

CMH, complexe majeur d'histocompatibilité

CTL, lymphocytes T cytotoxiques

CX3CL, *chemokine (C-X3-C motif) ligand*

CX3CR, *chemokine (C-X3-C motif) receptor*

CXCL, *chemokine (C-X-C motif) ligand*

CXCR, *chemokine (C-X-C motif) receptor*

DC, cellules dendritiques

DC-SIGN, *DC-specific intracellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin*

DR4, *death receptor 4*

FAS, *apoptosis stimulating fragment*

GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*

IFN, interféron

IL, interleukine

IP-10, *interferon gamma-induced protein 10*

IRES, *internal ribosome entry site*

JFH-1, infection japonaise fulgurante du VHC

KIR, *killer immunoglobulin-like receptors*

LCMV, virus de la chorioméningite lymphocytaire

LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen 1*
LPS, lipopolysaccharide
LSEC, cellules endothéliales du foie (de *liver sinusoidal endothelial cell*)
L-SIGN, *liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin*
MCMV, cytomégalovirus de la souris
mDC, cellule dendritique myéloïde
MDDC, cellule dendritique dérivée de monocytes
MICA/B, *major histocompatibility complex class I chain-related gene A and gene B*
MIP-1, *macrophage inflammatory protein-1*
NCR, récepteurs de cytotoxicité naturelle
NK, *natural killer*
NS, non structural
PAMP, motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular pattern*)
PBMC, cellules mononuclées du sang périphérique
pDC, cellule dendritique plasmacytoïde
PD-1, *programmed cell death 1*
PD-L1, *programmed cell death 1 ligand 1*
PRR, *pattern recognition receptor*
RLR, *retinoic acid inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor*
SNP, polymorphismes à simple nucléotide
SRB1, *scavenger receptor class B type I*
TCR, récepteur de lymphocyte T
Th, lymphocytes T auxiliaires
TLR, *Toll-like receptor*
TNF- α , *tumor necrosis factor*
TRAIL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
Treg, lymphocytes T régulateurs
ULBP1-4, *UL16 binding protein*

VHC, virus de l'hépatite C

VIH, virus de l'immunodéficience humaine

Remerciements

Je tiens d'abord et avant tout, à remercier ma directrice de recherche, Dre Naglaa Shoukry, de m'avoir supervisée tout au long de mon doctorat, mais également pour son support, sa confiance en moi et sa grande disponibilité. Naglaa, tu m'as enseigné, tu m'as transmis quantité de connaissances, tu m'as préparée pour le futur, et je t'en serai toujours extrêmement reconnaissante.

Je désire également remercier mes collègues de travail présents et passés. En premier, je tiens à remercier Nathalie qui a été présente pour moi du début à la fin malgré quelques interruptions. Je la remercie d'avoir créé un endroit agréable à travailler, mais également pour toutes ces heures de dîner/café passées ensemble à discuter de tout et de rien. Nath, tu es une collègue extraordinaire et j'espère avoir la chance de continuer à travailler avec toi dans les années futures. Je remercie également mon ami Hassen pour nos nombreuses discussions et pour tous ses conseils précieux dans les moments difficiles. J'espère que tu resteras dans le coin car tu vas me manquer. C'est maintenant à toi Mohamed à qui je veux dire merci pour ta bonne humeur contagieuse et tes encouragements continus. À Thomas. Merci d'avoir partagé tes talents artistiques et d'avoir embelli cette thèse! À Julie. Merci pour les belles discussions et pour les petites douceurs faites maison que tu apportes de temps en temps. Ne t'inquiètes pas, tu trouveras ta place. Je remercie aussi les deux françaises qui ont récemment rejoint notre labo, Camille et Marion. Vous êtes un bel ajout à notre équipe et j'espère qu'on aura encore des moments sympathiques ensemble. Parmi les membres passés du labo, la présence de Christian, Anna, Jean-François et Elias m'a particulièrement touchée. Je garde un très bon souvenir de nos moments passés ensemble et je suis heureuse qu'on puisse garder contact. Finalement, je dois remercier tous mes collaborateurs qui ont grandement contribué à la réalisation de ce projet de doctorat : Dre Julie Bruneau, Dr Bernard Willems, Dre Petronela Ancuta, Dr Salim Khakoo, Dre Anne-Sophie Dugast, Dre Galit Alter, ainsi que le personnel de la cohorte St-Luc.

Je désire également remercier d'autres gens de St-Luc. Particulièrement, mon amie Karin qui, comme moi, a vécu l'aventure d'un doctorat. Merci pour ton soutien, ton encouragement, ton écoute et

merci pour avoir partagé les bons et les moins bons moments avec moi. Je remercie aussi les Manon (Bourcier et Livernois). Vous ne savez pas à quel point nos discussions parfois banales, parfois animées, mais toujours intéressantes, m'ont fait du bien. Merci pour votre écoute et vos précieux conseils.

Je n'aurais pas réussi cette thèse sans le soutien de mes amis. Merci d'abord à Marie-Andrée, mon amie, mon ancienne coloc et mon ancienne collègue. Même à des milliers de kilomètres tu es toujours là pour moi quand j'ai besoin qu'on m'écoute et qu'on me conseille. Comme tu l'as si bien dit, je suis contente que tu m'aies convaincue de faire un stage dans ton équipe de recherche! Merci également de m'avoir présentée à tes amis Laïla, Cécile, Yan, Julien et Audrey qui sont devenus des amis indispensables pour moi.

Finalement, je désire remercier du fond de mon cœur ma gang de « brayons » du N.-B. Merci à mes parents, ma sœur et mon frère pour leurs encouragements et leur amour. Sans eux, je n'aurais sans doute pas tenu le coup. Je tiens également à remercier mes deux amies Monica et Olga. Malgré la distance qui nous sépare, merci de m'accueillir à bras ouverts chaque fois que je retourne dans mon patelin, comme si les mois passés sans se voir n'avaient jamais existés.

SECTION 1 : INTRODUCTION

1.1 L'infection par le virus de l'hépatite C

1.1.1 Épidémiologie

Depuis sa découverte en 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) est identifié comme étant une des causes majeures de maladies chroniques du foie. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que la prévalence mondiale de l'infection par le VHC est de 2%, mais que celle-ci varie en fonction des régions géographiques (1). Dans les pays industrialisés comme le Canada, la prévalence peut être aussi faible que 0,8%, mais elle peut aussi atteindre 22% dans certains pays comme l'Égypte (Figure 1). Le VHC cause une infection chronique dans 55-85% des cas, alors que la guérison spontanée survient dans seulement 15-45% des cas (2). La transmission du VHC est surtout par voie parentérale. Avant le dépistage du VHC dans les dons de sang qui est apparu au début des années '90, les transfusions sanguines étaient responsables de la majorité des nouvelles infections. Aujourd'hui, l'utilisation de drogues injectables et le partage de seringues sont la cause principale des nouveaux cas d'infections au Canada (3), alors que les injections thérapeutiques non sécuritaires sont encore fréquents dans les pays sous développés. Les transmissions périnatale et sexuelle du VHC sont possibles mais beaucoup plus rares que la transmission du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) par exemple.

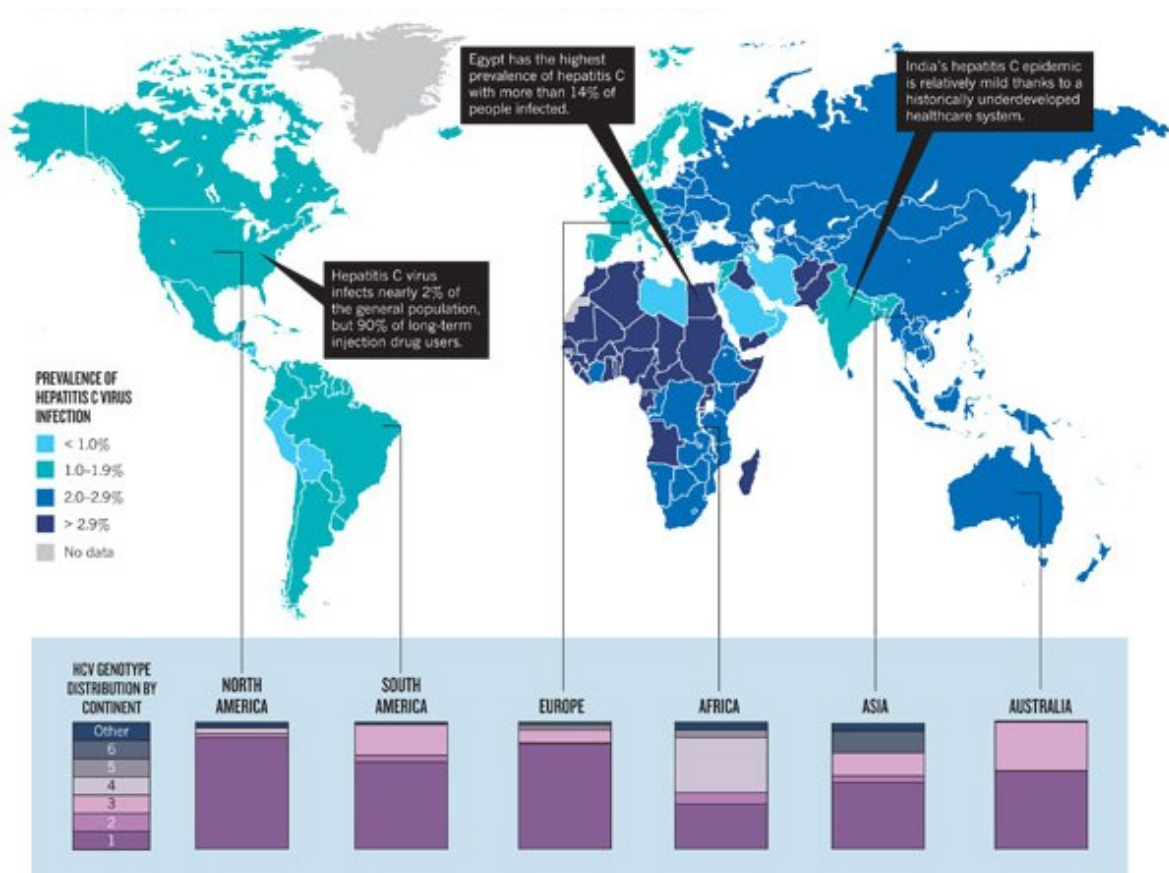


Figure 1: Prévalence mondiale de l'infection par le VHC.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature (4), droit d'auteur 2011.

Légende : La prévalence de l'infection par le VHC est représentée pour tous les pays dans la carte géographique, alors que la distribution des 6 génotypes majeurs du VHC pour tous les continents est représentée au bas de la figure.

1.1.2 Évolution de l'infection par le VHC

L'infection par le VHC est habituellement asymptomatique suite à la transmission. Des études effectuées chez le chimpanzé, qui est le seul animal pouvant être infecté, ont démontré la présence de l'ARN du VHC dans le sang à peine quelques jours suivant l'infection (5). À ce même moment, les niveaux d'interférons (IFN) de type I s'élèvent dans le foie (6-8). Des études subséquentes ont été menées auprès de travailleurs de la santé s'étant accidentellement infectés en milieu de travail et dont la date d'infection est connue. Ces études ont démontré que de 8 à 12 semaines suivant l'infection initiale, les niveaux d'alanine aminotransférase (ALT), un marqueur de dommages hépatiques, augmentent, alors que les anticorps et les lymphocytes T spécifiques pour le VHC deviennent détectables (9). C'est à ce moment qu'une minorité des patients développe des symptômes et que le VHC est diagnostiqué. De plus, c'est pendant les 6 premiers mois d'infection donc pendant la phase aiguë que 15-45% des patients guérissent de façon spontanée (Figure 2). La guérison spontanée est multifactorielle et certains de ces facteurs seront discutés dans les sections suivantes. De plus, la guérison spontanée après 6 mois d'infection est plutôt rare donc ceux qui n'éliminent pas le virus pendant la phase aiguë évoluent vers la phase chronique qui peut durer plusieurs décennies. Après plusieurs années, les patients chroniques sont à risque de développer une fibrose hépatique qui peut potentiellement mener à une cirrhose et même un carcinome hépatocellulaire. Effectivement, les dommages hépatiques causés par le VHC sont une des causes majeures du développement d'un carcinome hépatocellulaire et de la transplantation du foie.

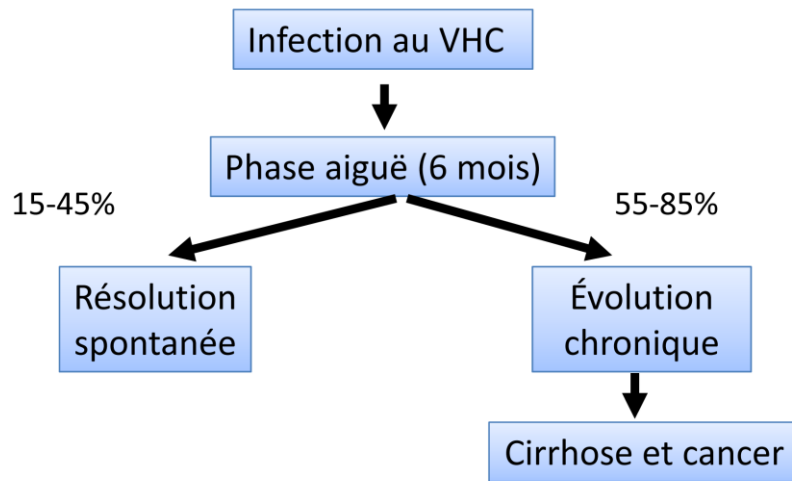


Figure 2 : Évolution de l'infection par le VHC.

Légende : Pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC, donc les premiers 6 mois d'infection, seulement une minorité guérit spontanément alors que la majorité évolue vers une infection chronique. Après plusieurs années d'infection, les patients sont à risque de développer une cirrhose du foie et même un carcinome hépatocellulaire.

1.1.3 Le traitement contre l'infection par le VHC

Il n'existe présentement aucun vaccin prophylactique contre l'infection par le VHC. Le VHC est un virus qui se réplique très rapidement et qui possède une polymérase sujette aux erreurs. Ces deux facteurs entraînent de nombreuses mutations au niveau de la séquence du VHC donc le virus existe sous forme de quasi-espèce au sein de l'hôte. Le développement d'un vaccin préventif est alors extrêmement difficile étant donné qu'il n'existe aucune séquence qui se retrouve chez tous les patients infectés.

Le traitement standard contre l'infection par le VHC est une combinaison d'IFN- α pégylé, une cytokine aux propriétés antivirales et pro-inflammatoires, et de ribavirin, un médicament aux propriétés antivirales dont le mécanisme demeure mal compris. Globalement, le taux de guérison du traitement est de 50%, mais peut atteindre 80% dans les cas d'infections par le génotype 2 ou 3 et si la thérapie débute tôt pendant la phase aiguë. De plus, selon le génotype du VHC, le traitement a une durée de 24 ou 48 semaines. En plus d'être de longue durée, ce traitement entraîne de nombreux effets secondaires tels que la fatigue, l'anémie, la dépression et des symptômes ressemblant à ceux de la grippe. Pour ces raisons, ce traitement est parfois contre-indiqué chez certains patients avec des antécédents de troubles mentaux. Finalement, la majorité des nouveaux cas d'infections par le VHC surviennent chez les utilisateurs de drogues injectables qui sont une population difficile à traiter soit parce qu'ils refusent ou qu'ils n'adhèrent pas correctement à ce traitement complexe.

La faible efficacité, la longue durée et les effets secondaires du traitement à base d'IFN- α et de ribavirin ont poussé les chercheurs à développer de nouveaux traitements. Deux médicaments qui agissent directement sur la réplication virale ont récemment été approuvés par Santé Canada (10). Le bocéprévir et le télaprévir sont des inhibiteurs de la protéase non structurale 3/4A (NS3/4A) du VHC. En combinaison avec l'IFN- α pégylé et le ribavirin, ces nouveaux inhibiteurs de protéase améliorent le taux de guérison et diminuent la durée du traitement chez les patients infectés par le génotype 1 du VHC (11, 12).

Malgré ces avancements, le but ultime est de traiter l'infection par le VHC sans avoir recours à l'IFN- α . De nombreux antiviraux tel que l'IFN- λ , les inhibiteurs de la protéase NS3/4A, de la polymérase NS5B et du complexe répliatif NS5A sont présentement en phase clinique. D'abord, l'IFN-

λ pourrait être une alternative intéressante à l'IFN- α . Une étude préliminaire a démontré que le traitement à base d'IFN- λ augmente le taux de RVR (de *rapid virological response*, ce qui correspond à une virémie indétectable 4 semaines suivant le début du traitement) en comparaison avec le traitement à base d'IFN- α (13). De plus, l'IFN- λ semble cibler plus spécifiquement les hépatocytes contrairement à l'IFN- α qui cible également les cellules épithéliales et hématologiques, ce qui réduit considérablement les effets secondaires pendant le traitement. De plus, bien que le bocéprévir et le télaprévir soient efficaces, de nouveaux inhibiteurs de protéases plus puissants et capables de bloquer la résistance virale sont présentement en phase clinique. C'est le cas du BI201335 (14) et du TMC435 (15) qui semblent prometteurs dans les études cliniques et qui nécessitent une seule dose quotidienne contrairement aux autres inhibiteurs de protéases sur le marché. Le Asunaprevir, un autre inhibiteur de protéases, en combinaison avec le daclatasvir, un inhibiteur du complexe de réplication NS5A, sont les premiers antiviraux à être utilisés en absence d'IFN- α /ribavirin (16). Cette étude a démontré que la combinaison de ces deux antiviraux a une efficacité modeste contre l'infection par le VHC. Même si le taux de guérison sont inférieur au traitement standard à base d'IFN- α /ribavirin, cette étude suggère que des traitements sans IFN- α pourront potentiellement apparaître sur le marché prochainement. De plus, des inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la polymérase NS5B sont également en phase clinique en combinaison avec l'IFN- α /ribavirin et semblent très prometteurs [révisé dans (17)]. Finalement, il y a une nouvelle classe d'antiviraux qui cible des protéines de l'hôte plutôt que des protéines virales. L'Alisporivir, un inhibiteur de cyclophilin, fait partie de cette classe. La cyclophilin A est une enzyme de l'hôte avec une activité peptidyl-prolyl isomérase et elle soutient la réplication du VHC. Des études cliniques ont démontré que la combinaison de l'Alisporivir et de l'IFN- α /ribavirin augmente le taux de guérison comparativement à l'IFN- α /ribavirin seul, ce qui en fait une alternative thérapeutique intéressante (18).

Malgré les nombreux avancements dans le traitement contre l'infection par le VHC, d'autres études sont requises pour développer un vaccin préventif et des nouveaux médicaments plus performants et mieux tolérés par les patients traités.

1.1.4 Le virus

Le VHC est un virus à ARN de polarité positive, il est enveloppé, est classé dans la famille des Flaviviridae et est le seul membre du genre *Hepacivirus* (19). Six génotypes majeurs et plus de 100 sous-types ont été identifiés. Le VHC est souvent associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL, de *low density lipoprotein*) et de très faible densité (VLDL, de *very low density lipoprotein*) qui sont importantes pour l'entrée du virus dans les hépatocytes et pour l'assemblage des particules virales [révisé dans (20)]. L'attachement initial du VHC aux hépatocytes se ferait probablement par l'intermédiaire des glycosaminoglycanes et des récepteurs de LDL. Ensuite, le VHC se lie à quatre récepteurs principaux pour entrer et infecter les hépatocytes, soit le CD81 (21), le SRB1 (de *scavenger receptor class B type I*) (22) et les protéines de jonctions claudin (23) et occludin (24). D'autres molécules facilitent également l'entrée du VHC dans les cellules, telles que les récepteurs DC-SIGN (de *DC-specific intracellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin*) et L-SIGN (de *liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin*). La traduction du génome génère dix protéines structurales et non structurales (Figure 3). La capsid et les deux protéines de l'enveloppe E1 et E2 sont parmi les protéines structurales, alors que les protéines NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B font partie des protéines non structurales. Les protéines de l'enveloppe sont importantes pour l'entrée du VHC dans les hépatocytes, d'ailleurs par la liaison de la protéine E2 au CD81 et au SRB1. Le rôle de la protéine E1 n'est pas aussi bien défini, mais elle semble faciliter l'entrée du VHC en s'associant avec des alipoprotéines (25). Les protéines non structurales du VHC sont surtout impliquées dans la réplication virale. L'auto-protéase NS2/3 possède un seul site de clivage alors que la protéase NS3/4A clive la polyprotéine en 4 sites. La partie C-terminale de la protéine NS3 code également pour une ARN hélicase qui semble catalyser l'ouverture de l'ARN lors de la réplication. La protéine NS4B semble impliquée dans la formation de structures vésiculaires nommées « *membranous web* » qui forment probablement le site de réplication virale. Finalement, la protéine NS5A est également importante pour la réplication virale, alors que la protéine NS5B est une ARN polymérase ARN-dépendante. Plusieurs protéines du VHC semblent jouer un rôle dans l'assemblage de la capsid et de l'ARN génomique, ainsi que dans le relâchement des virions à l'extérieur des cellules hôtes, mais les différentes étapes ne sont pas bien définies.

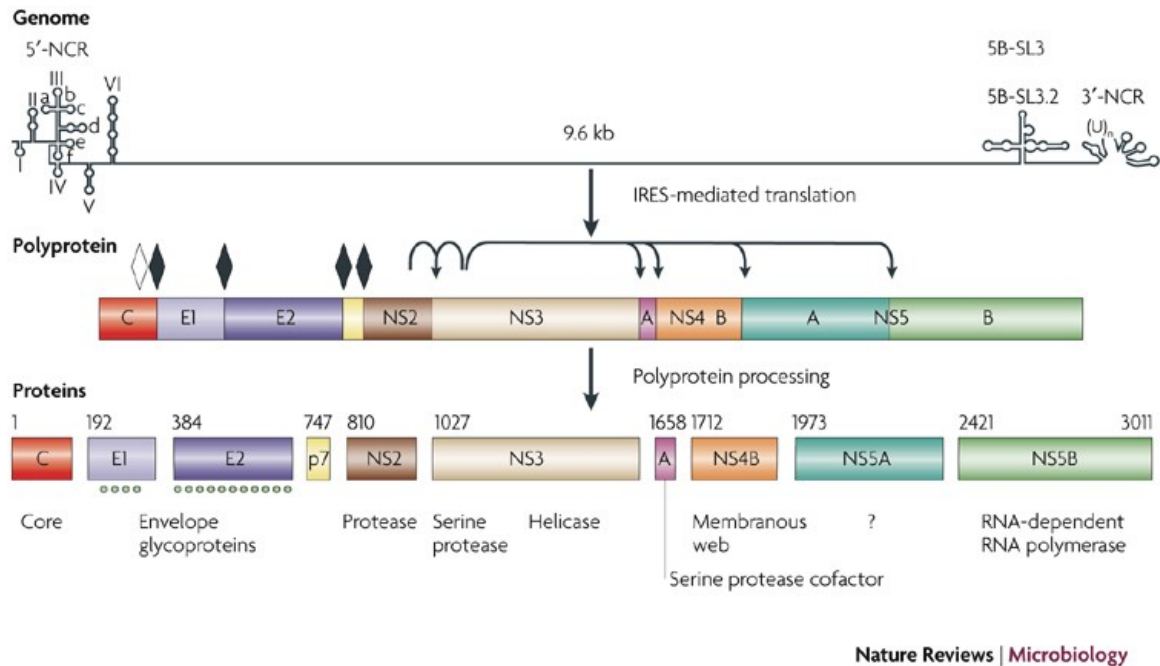


Figure 3 : Les protéines structurales et non structurales du VHC.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology (26), droit d’auteur 2007.

Légende : La traduction de l’ARN en une polyprotéine est médiée par l’IRES (de *internal ribosome entry site*). Le clivage de la polyprotéine en plusieurs protéines matures structurales et non structurales (NS) est assuré par des peptidases de la cellule hôte (sites de clivage désignés par les losanges blancs et noirs) et par les protéases NS2-3 et NS3-4A du VHC (sites de clivage désignés par les flèches). La fonction des protéines est décrite au bas de la figure.

1.2 Le système immunitaire

1.2.1 Les cellules NK

1.2.1.1 Les sous-populations de cellules NK

Les cellules NK (de *natural killer*) sont les cellules effectrices les plus importantes de la réponse immunitaire innée. Elles représentent 5-20% des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, de *peripheral blood mononuclear cells*), mais peuvent représenter jusqu'à 30-50% des lymphocytes dans le foie (27). Elles sont identifiées selon leur expression du CD3⁻, CD56⁺ et CD16⁺, mais peuvent être distinguées davantage en trois sous-populations. Les cellules NK CD16⁺CD56^{dim} représentent 90%, les cellules CD16⁻CD56^{bright} représentent 10% et les cellules CD16⁺CD56⁻ représentent 1-3% des cellules NK au niveau périphérique. Il n'y a présentement aucune preuve directe, mais de nombreuses études suggèrent que les cellules NK CD16⁻CD56^{bright} sont les précurseurs des cellules CD16⁺CD56^{dim}. D'abord, il a été démontré que les cellules NK CD16⁻CD56^{bright} possèdent des télomères plus longs que les cellules NK CD16⁺CD56^{dim} ce qui suggère qu'elles ont moins proliféré (28, 29). Deuxièmement, contrairement aux cellules NK CD16⁺CD56^{dim}, les cellules CD16⁻CD56^{bright} expriment le CD117 mais n'expriment pas le CD57, deux récepteurs exprimés par les cellules progénitrices et sénescents, respectivement (30-32). Finalement, la différenciation de cellules NK à partir de cellules progénitrices hématopoïétiques donne lieu à des cellules CD16⁻CD56^{bright} (33-36). En ce qui concerne la sous-population CD16⁺CD56⁻, elle représente une minorité des cellules NK chez les donneurs sains, mais sa fréquence augmente pendant certaines infections chroniques comme le VIH (37, 38). Cette sous-population de cellules NK est dysfonctionnelle et elle serait peut-être à un stade de différenciation très avancé, mais aucune étude à présent ne supporte cette hypothèse.

1.2.1.2 Les récepteurs inhibiteurs et activateurs de cellules NK

Les cellules NK sécrètent de nombreuses cytokines pouvant moduler les réponses immunitaires innée et adaptative. De plus, elles ont la capacité de lyser les cellules tumorales et infectées. Ces deux fonctions sont régulées par l'équilibre entre les signaux reçus par les récepteurs inhibiteurs et activateurs exprimés à la surface des cellules NK (Figure 4). Parmi les récepteurs inhibiteurs, il y a certains KIR (de *killer immunoglobulin-like receptors*), le CD94-NKG2A et le CD161. Les ligands des KIR sont des

molécules classiques du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (HLA-A, B et C) exprimées par la grande majorité des cellules du corps. Il existe plus d'une dizaine de KIR et chaque individu peut posséder entre 9 et 14 KIR dans son génome (39, 40). De plus, tous les KIR sont polymorphiques donc il existe plusieurs allèles pour chaque gène (41). Les cellules NK n'expriment pas tous les KIR présents dans le génome, c'est-à-dire que chaque clone de cellules NK exprime différentes combinaisons de KIR (42). Ceci assure un répertoire diversifié de cellules NK capables de détecter des changements infimes au niveau de l'expression du CMH de classe I. Un autre important récepteur inhibiteur de cellules NK est le CD94-NKG2A. Ce récepteur hétéro-dimérique reconnaît les molécules non-classiques du CMH de classe I (HLA-E). Les molécules de HLA-E présentent des peptides dérivés de molécules classiques et non-classiques du CMH de classe I. Les cellules NK exprimant le CD94-NKG2A sont donc capables de capter l'expression globale des molécules de CMH de class I. Finalement, le CD161 est également un récepteur inhibiteur de cellules NK et son ligand est le *lectin-like transcript 1* (43, 44).

Parmi les principaux récepteurs activateurs de cellules NK, il y a le CD16, le NKG2D, les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR, de *natural cytotoxicity receptors*) et certains KIR. Le CD16 ou récepteur Fcγ IIIA est capable de se lier à la région Fc des immunoglobulines et son rôle sera discuté plus en détails dans les sections suivantes. Pour sa part, le NKG2D est exprimé à la surface de toutes les cellules NK. Ses ligands, MICA/B (de *major histocompatibility complex class I chain-related gene A and gene B*) et ULBP1-4 (de *UL16 binding protein*) ne sont pas exprimés par les tissus normaux, mais sont plutôt induits dans des conditions de stress tel qu'une infection virale ou une transformation maligne (45). Les NCR sont composés du NKp30, NKp44 et NKp46. Les ligands du NKp30 sont la protéine pp65 du cytomégalovirus humain (46), le BAT3 (de *HLA-B-associated transcript 3*) (47) et le B7-H6 (48) tous deux exprimés par les cellules tumorales. Le NKp44 et le NKp46 peuvent tous les deux se lier à l'hémagglutinine de l'influenza et du virus Sendai (49). Le NKp44 reconnaît également la protéine constituant l'enveloppe du virus dengue et du virus West Nile (50, 51). Cependant, il est probable que d'autres ligands pour les NCR existent, mais d'autres études sont requises pour les identifier (52). Finalement, certains KIR sont des récepteurs activateurs et ils peuvent être important pour certains processus physiologiques. Par exemple, l'activation des cellules NK KIR2DL4⁺ suite à la

liaison du HLA-G sécrété par le fœtus au niveau de l'utérus joue probablement un rôle important dans le remodelage vasculaire pendant la grossesse [révisé dans (53)].

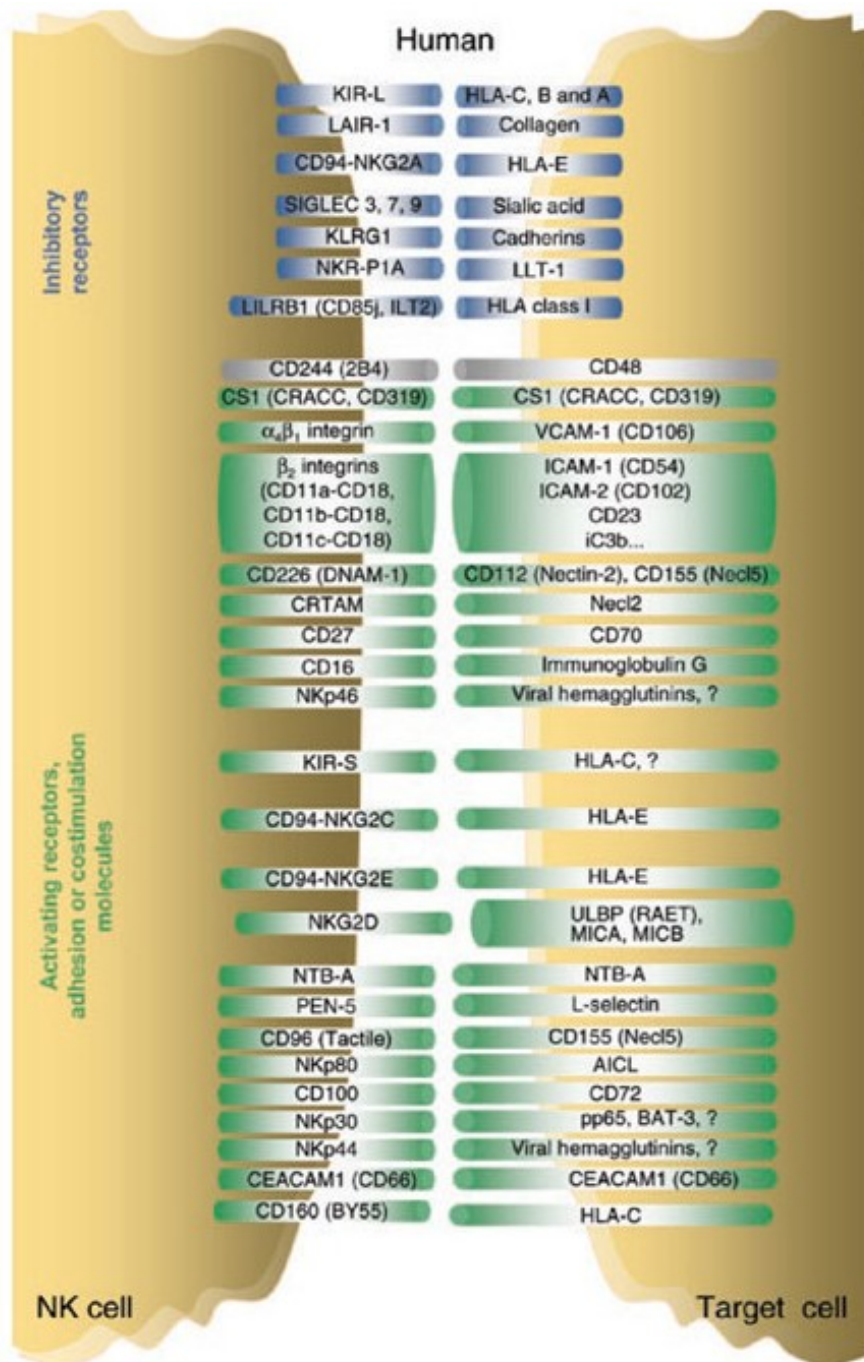


Figure 4 : Les récepteurs inhibiteurs et activateurs de cellules NK et leurs ligands.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Immunology (54), droit d'auteur 2008.

Légende : Les récepteurs de cellules NK sont listés à gauche et leurs ligands à droite. Les récepteurs inhibiteurs sont représentés en bleu, alors que les récepteurs activateurs, les molécules d'adhésion et les molécules de co-stimulation sont représentés en vert.

1.2.1.3 Production de cytokines par les cellules NK

Les cellules NK sécrètent diverses cytokines et chimiokines tel que l'IFN- γ , TNF- α (de *tumor necrosis factor*), GM-CSF (de *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), MIP-1 α (de *macrophage inflammatory protein-1 α*) et MIP-1 β . Ces cytokines et plus particulièrement l'IFN- γ ont des propriétés antivirales et anti-tumorales (55). De plus, l'IFN- γ peut moduler les réponses immunitaires innée et adaptative via les cellules dendritiques (DC, de *dendritic cell*) et les lymphocytes T respectivement, et ce rôle sera discuté davantage dans les sections suivantes. Les cellules NK CD16⁻CD56^{bright} produisent des cytokines en grande quantité (56), mais des études récentes ont démontré que les cellules NK CD16⁺CD56^{dim} peuvent également sécréter des cytokines rapidement et abondamment suite à la liaison de récepteurs activateurs avec leurs ligands (57, 58). La sécrétion de cytokines par les cellules NK peut être induite par des cytokines telles que l'interleukine (IL)-2, l'IL-12, l'IL-15 ou l'IL-18, ou par l'engagement de récepteurs activateurs tels que le CD16, le NKG2D et les NCR (59). L'IL-2 peut être produit par les lymphocytes T activés et les DC, alors que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 peuvent être produites par les monocytes, les macrophages et les DC, ce qui démontre l'importance des interactions entre les cellules du système immunitaire dans sa régulation.

1.2.1.4 Cytotoxicité des cellules NK

Les cellules NK peuvent lyser les cellules cibles par dégranulation des perforines et granzymes ou par la liaison des récepteurs de mort cellulaire avec leurs ligands tels que le TRAIL (de *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et le FAS (de *apoptosis stimulating fragment*) (Figure 5).

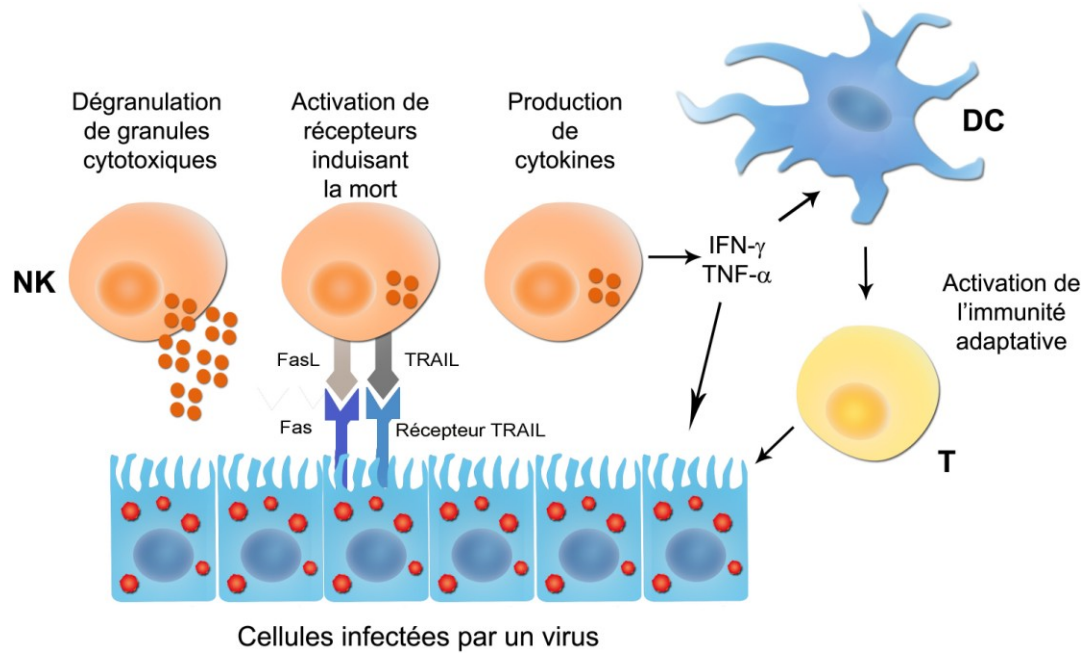


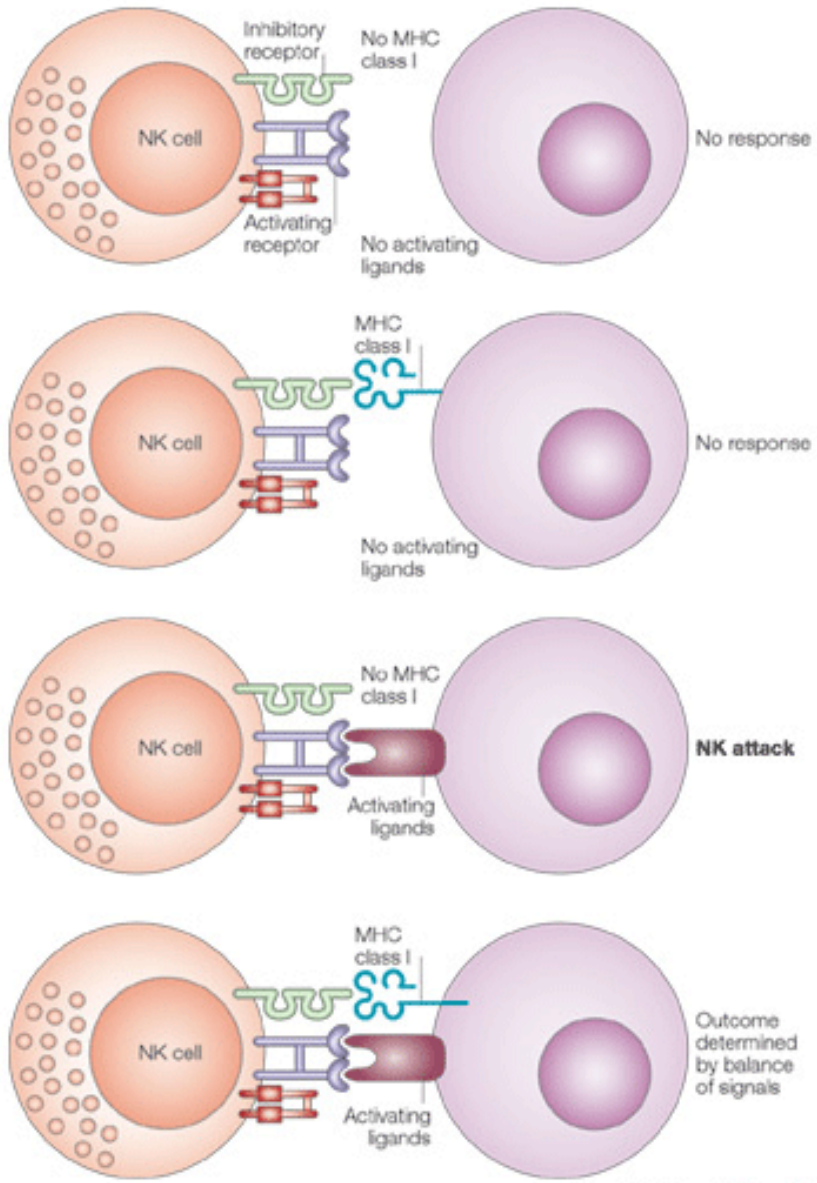
Figure 5 : Fonctions des cellules NK

Légende : Les cellules NK ont la capacité de lyser des cellules infectées ou tumorales via la dégranulation de granules cytotoxiques ou via l'activation de récepteurs induisant la mort tels que le FAS ou les récepteurs TRAIL. Les cellules NK sécrètent également des cytokines aux propriétés antivirales et immuno-modulatrices qui peuvent induire la maturation des DC et ainsi contribuer au développement de la réponse immunitaire adaptative subséquente.

La lyse des cellules cibles par les cellules NK peut être dépendante ou indépendante des anticorps. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, de *antibody-dependant cellular cytotoxicity*) est médiée spécifiquement par les cellules NK CD16⁺CD56^{dim}. Le CD16 est aussi appelé le récepteur Fcγ IIIA de faible affinité et il peut se lier à la région constante (Fc) des immunoglobulines lorsqu'elles recouvrent la surface des cellules infectées ou tumorales. Les cellules NK reçoivent alors un signal activateur et lysent les cellules cibles par dégranulation des perforines et granzymes.

La lyse des cellules cibles par les cellules NK peut également être indépendante des anticorps et les cellules NK ne nécessitent aucune stimulation préalable pour accomplir cette fonction. Tel que mentionné précédemment, c'est l'équilibre entre les récepteurs activateurs et inhibiteurs qui dictera à la cellule NK de lyser ou non une cellule cible. Trois facteurs sont nécessaires pour déclencher la lyse par les cellules NK : absence d'inhibition, présence d'activation et éducation (Figure 6). Toutes les cellules du corps humain expriment le CMH de classe I, alors que toutes les cellules NK semblent exprimer au moins un récepteur inhibiteur reconnaissant le CMH de class I, soit un des KIR ou le CD94-NKG2A (42). Par conséquent, les cellules normales du corps sont protégées de la lyse par les cellules NK. Cependant, dans le cas d'une infection virale ou d'une transformation maligne, il arrive fréquemment que les cellules infectées ou tumorales diminuent leur expression du CMH de classe I. Ce mécanisme permet à ces cellules d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T, mais elles deviennent alors sensibles à la lyse par les cellules NK puisque ces dernières ne reçoivent plus de signaux inhibiteurs. Ce mécanisme a été nommé l'hypothèse de l'absence du soi (de *missing self hypothesis*) (60). Le deuxième facteur nécessaire pour la lyse de cellules cibles par les cellules NK est la présence d'activation. Tel que mentionné dans la section précédente, les récepteurs activateurs NCR peuvent reconnaître des protéines virales, alors que le NKG2D reconnaît des protéines induites par le stress. Pour cette raison, seules les cellules infectées ou malignes expriment les ligands pour les récepteurs activateurs. Le troisième facteur nécessaire pour qu'une cellule NK lyse une cellule cible est l'éducation. Si une cellule NK n'est pas éduquée pendant son développement, elle sera anergique. Cette éducation se fait par l'interaction entre un récepteur inhibiteur et son ligand, le CMH de classe I. Si un clone de cellules NK exprime un récepteur inhibiteur spécifique pour un CMH de classe I qui est absent dans le génome, ce clone sera anergique. Par exemple, une cellule NK n'exprimant que le KIR2DL3 qui reconnaît spécifiquement le HLA-C1, sera anergique si l'hôte ne possède que le HLA-C2 dans son génome. Deux modèles

d'éducation existent présentement. Le premier modèle suggère que les cellules NK sont anergiques au départ et deviennent « compétentes » lorsqu'un récepteur inhibiteur se lie au CMH de classe I lors du développement (61). Le second modèle propose que les cellules NK sont activées au départ et deviennent anergiques si aucun récepteur inhibiteur ne se lie au CMH de classe I en raison d'une stimulation chronique (62).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 6 : Régulation de la lyse de cellules cibles par les cellules NK

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology (63), droit d'auteur 2005.

Légende : Trois signaux sont nécessaires pour déclencher la lyse de cellules cibles par les cellules NK : absence d'inhibition, présence d'activation et éducation. Si une cellule cible ne possède pas le ligand (CMH de classe I) pour un récepteur inhibiteur exprimé par une cellule NK, cette dernière ne sera pas éduquée, donc sera anergique et ne lysera pas les cellules cibles (1^{er} scénario en haut de la figure). Si une cellule cible exprime le ligand pour un récepteur inhibiteur exprimé par une cellule NK (en absence d'activation), cette dernière sera inhibée donc ne lysera pas cette cellule cible (2^e scénario en haut de la figure). Si une cellule cible exprime le ligand pour un récepteur activateur exprimé par une cellule NK (en absence d'inhibition), cette dernière sera activée et lysera la cellule cible (3^e scénario en bas de la figure). Finalement, en présence d'inhibition et d'activation, ce sera l'équilibre entre ces signaux qui dictera à la cellule NK de lyser ou pas la cellule cible (4^e scénario en bas de la figure).

1.2.2 Les cellules dendritiques

Il existe deux populations de cellules dendritiques (DC, de *dendritic cell*) dans le sang périphérique, soit les DC plasmacytoïdes (pDC) et myéloïdes (mDC). Les pDC peuvent être distinguées des mDC selon leur expression du CD123 qui est le récepteur de l'IL-3 et l'expression du CD303 [BDCA (de *blood DC antigen*)-3], ainsi que selon leur capacité à sécréter de grandes quantités d'IFN- α (64, 65). Les mDC expriment le CD11c et peuvent être divisées en deux sous-populations : CD11c (BDCA-1)⁺ et CD141 (BDCA-3)⁺ (66).

Dans des conditions de repos, les DC sont dans un état immature, mais dans le cas d'une infection par un pathogène elles jouent un rôle crucial dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Cette initiation de la réponse immunitaire est dépendante de la capacité des DC à reconnaître des pathogènes et/ou des signaux de danger. Il existe présentement deux modèles : la reconnaissance du soi vs du non-soi et la reconnaissance de signaux de danger. La reconnaissance du soi vs du non-soi implique que les DC reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, de *pathogen-associated molecular pattern*) par des récepteurs reconnaissant ces motifs (PRR, de *pattern recognition receptor*) (67). Plusieurs PRR ont été décrits, notamment les TLR (de *Toll-like receptor*) et les RLR [de, *retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptor*] (68). Pour sa part, le modèle de reconnaissance de signaux de danger implique que les DC reconnaissent des tissus endommagés ou stressés plutôt que des pathogènes (69). Les DC immatures ont la capacité de reconnaître de tels tissus en récupérant par phagocytose ou endocytose les cellules apoptotiques présentes dans leur environnement. Peu importe le modèle, suite à la reconnaissance de pathogènes et/ou de signaux de danger, les DC immatures acquièrent un phénotype mature et deviennent activées (Figure 7). L'induction de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs par les DC requiert plusieurs signaux (70). Lors du processus d'activation, les DC diminuent la phagocytose, mais augmentent la dégradation d'antigènes et leur présentation sous forme de peptides aux lymphocytes T. Pour cette raison, les DC font partie des cellules présentatrices d'antigènes (APC, de *antigen presenting cell*). La reconnaissance de peptides par le récepteur de lymphocytes T (TCR, de *T cell receptor*) constitue le premier signal. Pendant le processus d'activation, les DC augmentent l'expression de molécules de co-stimulation afin d'envoyer un deuxième signal aux lymphocytes T. Par exemple, le CD80 (B7-1) et le CD86 (B7-2) sont

deux molécules de co-stimulation exprimées par les DC et elles se lient au CD28 à la surface des lymphocytes T. Finalement, la sécrétion de cytokines par les DC confère un troisième signal permettant la différenciation de lymphocytes T effecteurs.

En plus d'activer les lymphocytes T, les DC peuvent également induire la tolérance des lymphocytes T (71) par l'entremise d'autres membres de la famille B7:CD28 qui possèdent des fonctions co-inhibitrices. Le marqueur de co-inhibition PD-L1 (de *programmed cell death 1 ligand 1*) est exprimé par divers tissus de l'organisme alors que l'expression du PD-L2 est restreinte aux APC. PD-L1 et PD-L2 sont des ligands pour le PD-1 (de *programmed cell death 1*) qui est exprimé par les lymphocytes T activés. La signalisation par le PD-1 envoie un signal négatif aux lymphocytes T et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et de la production de cytokines (72, 73). L'interaction du PD-1 avec ses ligands est maintenant reconnue pour induire la différenciation de lymphocytes T effecteurs en cellules « épuisées ». L'expression du PD-1 par les lymphocytes T est d'ailleurs augmentée lors d'infections chroniques (74).

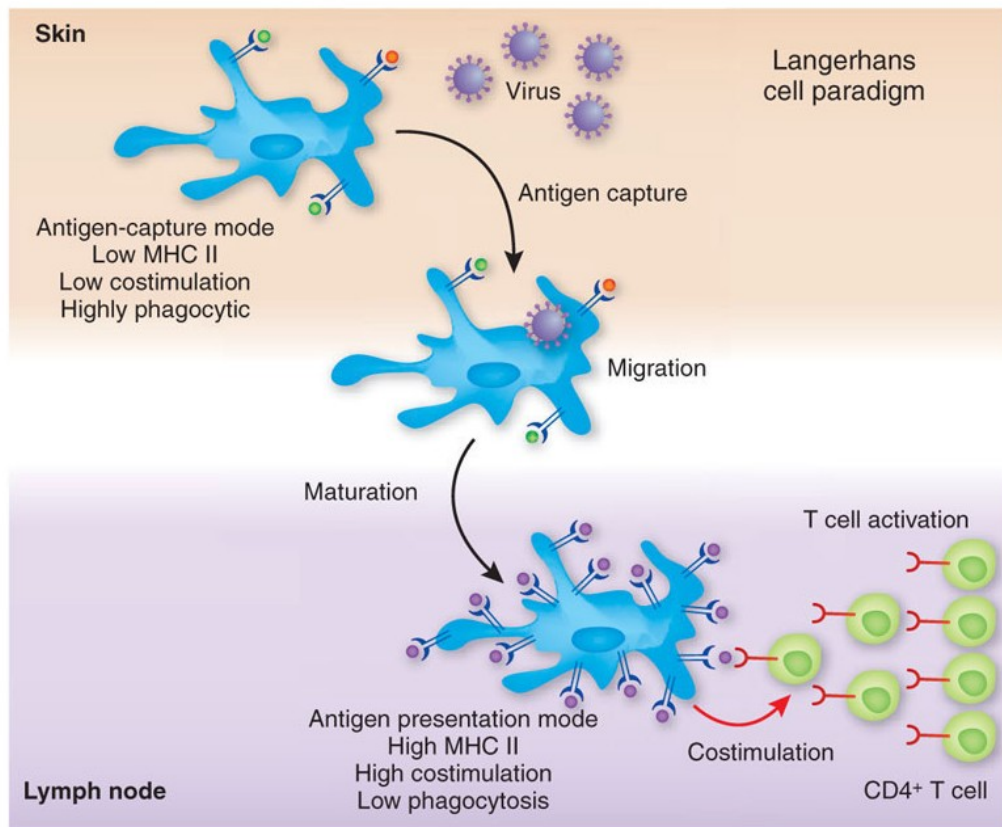


Figure 7 : Présentation de peptides antigéniques aux lymphocytes T par les DC.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Immunology (75), droit d’auteur 2009.

Légende : Les DC en périphérie ont une grande capacité à engouffrer des corps apoptotiques. Suite à la reconnaissance d’un pathogène, les DC acquièrent un phénotype mature en augmentant l’expression de molécules de co-stimulation et de molécules du CMH. Les DC expriment également des récepteurs de chimiokines leur permettant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent des peptides antigéniques et activent des lymphocytes T naïfs. Cette figure donne l’exemple des DC résidents de la peau, les cellules de Langerhans, mais la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires s’applique également aux DC résidents d’autres tissus en périphérie.

1.2.3 Les interactions NK/DC

Les cellules NK et les DC agissent non seulement de façon indépendante, mais interagissent également entre elles afin de potentialiser davantage leur capacité à réguler la réponse immunitaire. En effet, les cellules NK sont capables d'induire la maturation et de lyser les DC, alors que les DC sont capables d'activer les cellules NK. Ces interactions NK/DC ont pour conséquence de moduler les réponses immunitaires innée et adaptative (Figure 8).

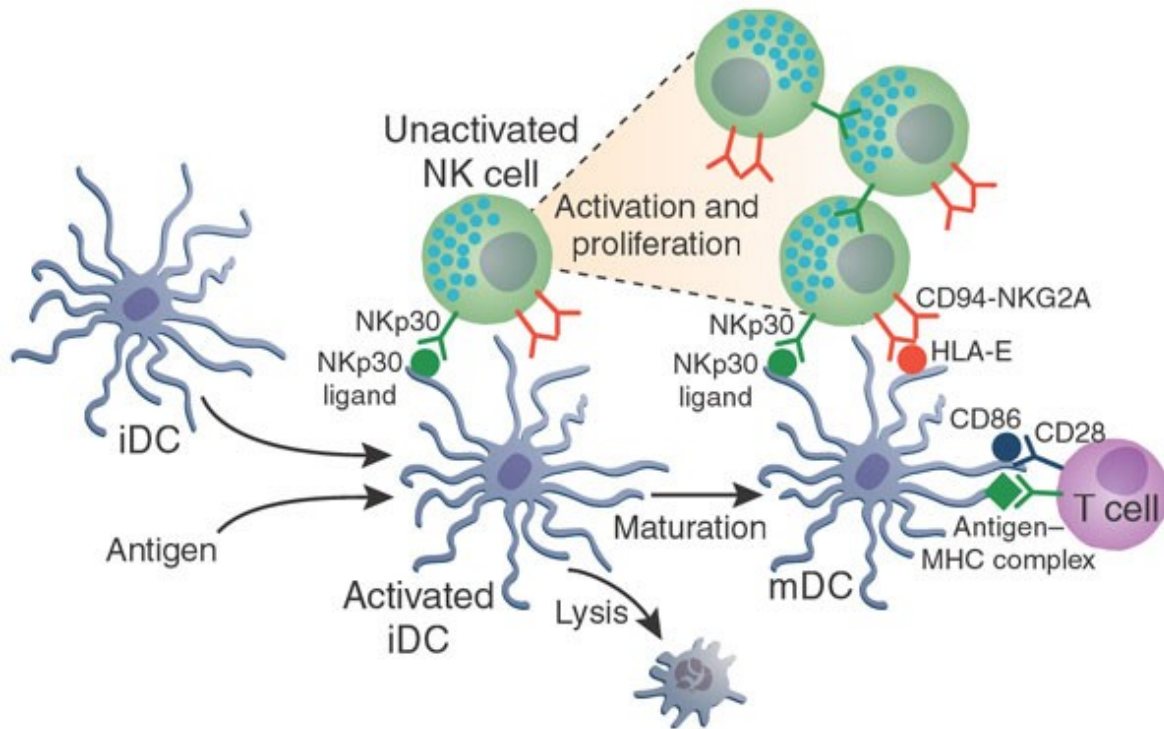


Figure 8 : Les interactions NK/DC.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Immunology (76), droit d'auteur 2004.

Légende : D'abord les DC matures ont la capacité d'activer les cellules NK, donc d'induire la production de cytokines, la cytotoxicité et la prolifération de ces cellules. Les cellules NK ont également la capacité d'induire la maturation des DC immatures, mais aussi d'induire leur lyse. La maturation des DC par les cellules NK dépend de l'interaction du NKp30 avec son ligand, mais dépend aussi de cytokines produites par les cellules NK. Pour ce qui est de la lyse des DC immatures, elle dépend également du NKp30, mais aussi de la faible expression du CMH de classe I, notamment du HLA-E, par les DC. La lyse des DC immatures assure que seules les DC immunogéniques, mais pas les DC tolérogéniques, rejoignent les organes lymphoïdes secondaires pour activer les lymphocytes T naïfs.

1.2.3.1 Les lieux potentiels d'interactions NK/DC

Bien que les cellules NK et les DC sont présentes dans plusieurs organes, les études se sont principalement concentrées sur les organes lymphoïdes secondaires et les sites d'inflammation comme lieu de rencontre. Les cellules NK se retrouvent dans les organes lymphoïdes secondaires et elles sont localisées plus précisément dans les zones périfolliculaires des lymphocytes T (77-81). Contrairement aux cellules NK en périphérie, les cellules CD16⁻CD56^{bright} représentent 90% des cellules NK dans les organes lymphoïdes secondaires. En effet, les cellules NK CD16⁻CD56^{bright} en périphérie expriment fortement la L-sélectine, le CCR7 [de *chemokine (C-C motif) receptor 7*] et le LFA-1 (de *lymphocyte function-associated antigen 1*), leur permettant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (82-86). En ce qui concerne les DC, elles augmentent l'expression du CCR7 lors du processus de maturation donc elles sont aussi en mesure de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (87-90). Il est donc fort probable que les cellules NK et les DC interagissent dans les organes lymphoïdes secondaires.

Les sites d'inflammation sont également un lieu potentiel d'interactions NK/DC. Au cours de l'inflammation, divers types cellulaires tels que les cellules infectées et certaines cellules immunitaires comme les DC sécrètent de nombreuses chimiokines afin d'induire la migration des cellules NK aux sites d'inflammation. Les cellules NK CD16⁺CD56^{dim} expriment le CXCR1 [de *chemokine (C-X-C motif) receptor 1*] et le CX3CR1 [de *chemokine (C-X3-C motif) receptor 1*] qui sont les récepteurs pour le CXCL8 (de *CXC ligand 8*) et le CX3CL1 (de *CX3C ligand 1*), respectivement. De plus, les cellules NK CD16⁻CD56^{bright} expriment le CCR5, le CXCR3 et le CXCR4 qui leur permettent de migrer en réponse à CCL5 (de *CC ligand 5*), CCL4, CXCL11 et IP-10 (de *interferon gamma-induced protein 10*)/CXCL10 (82, 91).

1.2.3.2 Les cellules NK induisent la maturation des DC

Les cellules NK activées mais non celles au repos ont la capacité d'induire la maturation des DC immatures. À des faibles ratios de NK : DC, les cellules NK activées induisent l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation telles que le CD86, le CD83 et le HLA-DR, à la surface des DC, puis induisent la sécrétion de cytokines telles que l'IL-12 et le TNF- α , par les DC (92, 93). Ce mécanisme est à la fois dépendant des cytokines produites par les cellules NK et dépendant du contact entre ces deux types de cellules. D'abord la liaison du NKp30 à la surface des cellules NK avec son

ligand à la surface des DC induit la production d'IFN- γ et de TNF- α par les cellules NK, et la maturation subséquente des DC. De plus, la capacité d'induire la maturation des DC semble limitée aux cellules NK KIR⁺NKG2A^{dull} (94). La maturation des DC semble alors dépendre de l'équilibre entre les signaux activateurs provenant du NKp30 et des signaux inhibiteurs provenant des KIR et du NKG2A. En résumé, le fait que les cellules NK induisent l'expression de molécules de co-stimulation, la sécrétion de cytokines, et surtout l'expression du CCR7, suggère que les cellules NK incitent les DC à migrer à partir des sites d'inflammation vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'initier la réponse immunitaire adaptative.

1.2.3.3 Les cellules NK lysent les DC

Contrairement à la maturation des DC induite par les cellules NK qui survient à des faibles ratios de NK : DC, la lyse des DC induite par les cellules NK survient à des ratios élevés (92, 93). Plusieurs études suggèrent que les cellules NK contrôlent la population de DC en éliminant les DC tolérogéniques qui peuvent survenir lorsque les DC engouffrent des cellules apoptotiques en l'absence d'activation par les PAMP ou signaux de danger (70). Ce mécanisme préviendrait le développement de réponses tolérantes et permettrait uniquement aux DC immunogéniques d'atteindre les organes lymphoïdes secondaires. La lyse des DC induite par les cellules NK est dépendante du contact entre ces deux types de cellules et plus particulièrement de la liaison des récepteurs inhibiteurs et activateurs de cellules NK à leurs ligands. Les DC immatures expriment de faibles niveaux de CMH de classe I et donc de molécules HLA-E, et sont par conséquent sensibles à la lyse médiée par les cellules NK exprimant le NKG2A. En revanche, les DC matures expriment fortement le CMH de classe I donc elles sont plus résistantes à la lyse médiée par les cellules NK. La lyse des DC requiert non seulement des récepteurs inhibiteurs, mais également les récepteurs activateurs NKp30, NKp46 et DNAM-1 des cellules NK (95-97). Après engagement des ces récepteurs activateurs, les cellules NK induisent l'apoptose des DC immatures via la voie TRAIL -DR4 (de *death receptor 4*) (98, 99) ou par dégranulation des perforines et granzymes (100).

1.2.3.4 Les DC activent les cellules NK

Par ailleurs, les DC matures ont la capacité d'activer les cellules NK au repos. Cette activation est considérée comme une pré-activation des cellules NK leur permettant d'accomplir leurs fonctions au maximum de leur capacité, soit la lyse de cellules infectées et la sécrétion de cytokines. L'activation des cellules NK par les DC dépend à la fois du contact entre ces deux types de cellules et de la production de cytokines par les DC (92, 93, 101). L'IFN de type I est principalement produite par les pDC mais aussi par les mDC, et elle provoque surtout la lyse de cellules cibles par les cellules NK (102, 103). L'IL-12 et l'IL-18 produites par les DC induisent principalement la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK (77) et ceci dépend de la proximité des DC et des cellules NK permettant la sécrétion polarisée de ces cytokines au niveau de la synapse immunologique (104, 105). De plus, la présentation en trans de l'IL-15 par l'IL-15R α à la surface des DC est cruciale pour la survie et la prolifération des cellules NK exprimant les chaînes IL-15R β et γ (77, 106, 107). D'autres mécanismes dépendants du contact cellules-cellules, notamment la reconnaissance de ligands par le NKG2D (108), ont été également décrits comme étant importants pour l'activation des cellules NK par les DC. Finalement, une étude récente a démontré que la sécrétion d'exosomes par les DC de souris peut activer les cellules NK via le TNF transmembranaire à la surface des exosomes (109). Cette étude suggère que les DC peuvent également utiliser la voie paracrine/endocrine afin d'activer les cellules NK qui ne sont pas à proximité.

Même si les cellules NK sont activées par les DC matures, ces dernières possèdent des mécanismes afin de demeurer protégées contre la lyse médiée par les cellules NK. D'abord, au niveau de la synapse immunologique il y a enrichissement des molécules du CMH de classe I à la surface des DC et un enrichissement des KIR et du CD94 à la surface des cellules NK ce qui envoie un signal inhibiteur aux cellules NK. Ensuite, la polymérisation de l'actine filamenteuse au niveau des DC maintient cette interaction entre les CMH et les KIR/CD94 afin de prévenir la polarisation des granules cytotoxiques au niveau de la synapse immunologique (110, 111).

1.2.4 La réponse immunitaire à médiation cellulaire lors d'une infection par un pathogène

La réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire repose sur la génération de lymphocytes T effecteurs capables de contrôler une infection par un pathogène. D'un point de vue fonctionnel, il y a deux sous-populations bien définies de lymphocytes T. Les lymphocytes T auxiliaires (Th, de *helper*)

expriment généralement la molécule de surface CD4, alors que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL, de *cytotoxic T lymphocyte*) se distinguent habituellement par la présence de la molécule CD8.

Avant qu'un lymphocyte T ne reconnaisse un antigène spécifique, il est appelé naïf et circule entre les systèmes lymphatique et sanguin. Par contre, dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, lorsqu'un lymphocyte T CD4⁺ reconnaît par son TCR un peptide antigénique présenté par une molécule de classe II du CMH à la surface d'une APC, il devient activé. Tel que discuté dans les sections précédentes, la reconnaissance d'un peptide antigénique en combinaison avec des signaux de co-stimulation et des cytokines provenant des APC, est nécessaire à la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en cellules effectrices. Les APC et plus particulièrement les DC sécrètent de nombreuses cytokines aux propriétés polarisantes qui permettent la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ en différentes sous-populations de cellules effectrices, notamment les Th1, Th2 et Th17 (Figure 9). Par exemple, la production d'IL-12 par les DC, mais aussi d'IFN- γ par les cellules NK orientent un lymphocyte T CD4⁺ vers la lignée Th1. Les cellules Th1 produisent de l'IL-2 et de l'IFN- γ pour aider au développement d'une réponse antigène-spécifique médiée par les lymphocytes T CD8⁺. L'IL-4 produite par les DC favorise l'orientation vers la lignée Th2 qui à son tour sécrète de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 tous impliquées dans le contrôle des helminthes et autres pathogènes extracellulaires. Finalement, l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et le TGF- β produits par les DC favorisent l'orientation vers la lignée Th17 qui elle sécrète de l'IL-17 et de l'IL-22 tous impliquées dans l'élimination de bactéries et de champignons extracellulaires [révisé dans (112)]. Plus récemment, d'autres lignées Th ont été décrites. D'abord, l'IL-4 et le TGF- β favorisent l'orientation vers la lignée Th9. Cette lignée sécrète entre autres de l'IL-9 qui joue un rôle dans la protection contre et l'expulsion des helminthes, mais également dans le développement d'allergies et de l'asthme [révisé dans (113)]. La lignée Tfh (de *T follicular helper*) quant à elle, est requise pour le développement d'une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B [révisé dans (114)]. L'interaction ICOS/ICOS-L ainsi que la production d'IL-6 et d'IL-27 par les DC favorisent la polarisation des Tfh. L'expression du CXCR5 par les Tfh leur permet de migrer vers les centres germinatifs où elles interagissent avec les lymphocytes B et entraînent leur différenciation en lymphocytes B mémoires et en cellules plasmiques via le CD40L et la production d'IL-21.

De plus, les DC peuvent également activer les lymphocytes T CD8⁺ en présentant des peptides antigéniques liés aux molécules de CMH de classe I. Les lymphocytes T CD8⁺ activés se différencient en CTL capables d'induire la lyse et ainsi éliminer les cellules infectées. En procurant de l'aide, les lymphocytes T CD4⁺ participent au maintien de la fonction des lymphocytes T CD8⁺ et au développement de lymphocytes T CD8⁺ mémoires.

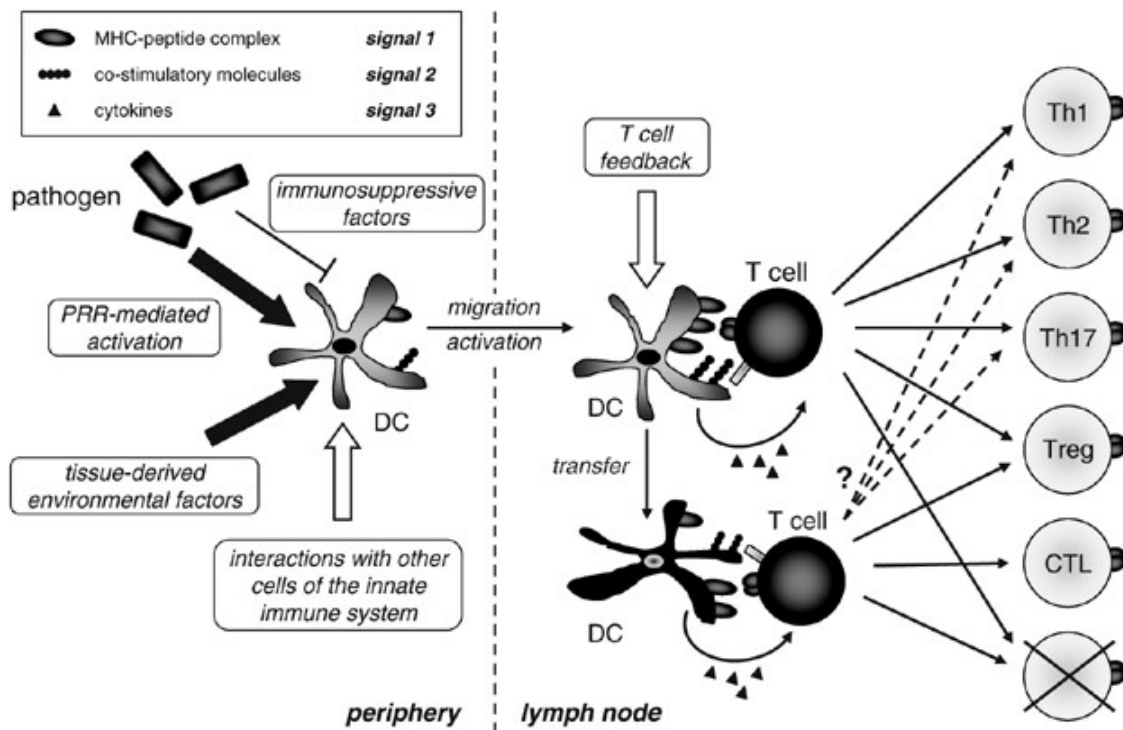


Figure 9 : Différentiation de lymphocytes T naïfs en différentes sous-populations de cellules effectrices.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Immunology and Cell Biology (115), droit d'auteur 2008.

Légende : Suite à leur activation en périphérie, les DC migrent vers les ganglions lymphatiques où elles induisent la différenciation de lymphocytes T naïfs en cellules effectrices. Il existe plusieurs sous-populations de cellules effectrices $CD4^+$: Th1, Th2, Th17 et lymphocytes T régulateurs (Treg). Les DC dérivées des tissus peuvent également transférer des antigènes aux DC résidant dans les ganglions lymphatiques.

1.3 Le rôle des cellules NK et des DC dans le contrôle d'infections virales

Les cellules NK participent au contrôle de plusieurs infections virales telles que le VIH et l'influenza, mais leur contribution est indispensable à l'élimination des virus de la famille des *Herpesviridae* tels que les virus de l'herpes simplex, le virus de la varicelle et le cytomégalovirus. En effet, deux études ont démontré que de jeunes patients possédant des cellules NK dysfonctionnelles souffraient de nombreuses et récurrentes infections virales de la famille des *Herpesviridae* (116, 117).

Les premières preuves démontrant le rôle crucial que jouent les cellules NK dans la protection de l'hôte contre une infection virale sont survenues à partir d'études sur le cytomégalovirus de la souris (MCMV, de *mouse cytomegalovirus*). Le contrôle de la réplication du MCMV par les cellules NK dépend de la reconnaissance de la protéine virale m157 par le récepteur activateur Ly49H des cellules NK. La liaison m157-Ly49H entraîne la mort des cellules infectées, la prolifération et la sécrétion de cytokines par les cellules NK [révisé dans (118)]. De plus, la délétion du gène codant pour le m157 du MCMV (119) ou du gène codant pour le Ly49H de l'hôte (120-122) entraîne la persistance du MCMV. De façon similaire, la transgénèse du gène Ly49H dans des souches de souris naturellement susceptibles a rendu ces souris résistantes au MCMV (123).

Les cellules NK semblent également participer au contrôle d'infections virales chez les humains. L'infection par le VIH-1, par exemple, est associée avec des défauts au niveau de la fonction des cellules NK. Ces défauts sont observés tôt après le début de l'infection et persistent tout au long de la progression de la maladie. Plus particulièrement, il existe une corrélation inverse entre la virémie et la suppression de la réplication virale médiée par les cellules NK (124). Plusieurs observations effectuées auprès des cellules NK de patients infectés par le VIH-1 pourraient possiblement expliquer ceci : une diminution des perforines et granzymes, ainsi qu'une diminution de la capacité cytotoxique des cellules NK (125), une diminution de l'expression des récepteurs activateurs NCR par les cellules NK (126), une augmentation de l'expression de certains marqueurs d'activation mais pas d'autres par les cellules NK suggérant une activation incomplète et possiblement une anergie (127).

Les interactions entre les cellules NK et les DC ont également été décrites chez les patients infectés par le VIH-1. D'abord, Mavilio *et al.* (128) ont démontré que les DC matures d'individus

infectés par le VIH avaient une faible capacité d'activer les cellules NK au repos, et que ceci était causé par une faible production de cytokines par les DC. De plus, les cellules NK activées de ces mêmes patients étaient également incapables d'éliminer les DC immatures, et ceci était probablement relié à la faible expression du NKp30 et du TRAIL (128, 129). Ces résultats ont ensuite été confirmés par deux études qui ont observé que la capacité des cellules NK à tuer des DC infectés par le VIH *in vitro* était diminuée (99, 130). L'une d'entre elles a d'ailleurs démontré chez des patients infectés par le VIH que contrairement aux DC périphériques, les DC isolées des organes lymphoïdes secondaires avaient un phénotype partiellement immature. Ce phénotype a été reproduit *in vitro* en traitant les DC avec de l'IL-10 exogène ou en infectant les DC avec le VIH. Ces deux traitements ont rendu les DC immatures plus résistantes et les DC matures plus sensibles à la lyse médiée par les cellules NK ce qui favoriserait l'accumulation de DC tolérogéniques dans les organes lymphoïdes secondaires (130).

Chez des patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite B (VHB), il a été démontré que la capacité des DC à activer les cellules NK est réduite (131). Ceci semble lié à la faible production de cytokines pro-inflammatoires par les DC après stimulation du TLR3. Cependant, les auteurs ont observé que la thérapie antivirale contre le VHB a rétabli l'activation des cellules NK induite par les DC, ainsi que la production de cytokines par les DC. Une autre étude récente a démontré que les cellules NK et les DC pourraient être impliquées dans une réaction nécro-inflammatoire au niveau du foie qui est essentielle à l'élimination du VHB (132). Cette étude a utilisé un modèle murin du VHB où le foie et les PBMC de la souris sont reconstitués par des cellules d'origine humaine. Les auteurs ont démontré que l'enrichissement de cellules NK FasL⁺ au niveau du foie coïncide avec la mort des hépatocytes humains et une baisse de la virémie. De plus, la déplétion des DC, de même que le blocage du Fas-FasL abolit la mort des hépatocytes. Cette étude pourrait suggérer que l'activation des cellules NK par les DC contribue à l'élimination des hépatocytes infectés par le VHB via la voie de Fas.

Ces résultats démontrent que les cellules NK et leurs interactions avec les DC peuvent être affectées pendant des infections virales chroniques, ce qui suggère que les virus ont développé des stratégies pour échapper aux cellules NK pour ainsi persister au sein de l'hôte.

1.4 La réponse immunitaire au VHC

1.4.1 Les cellules NK

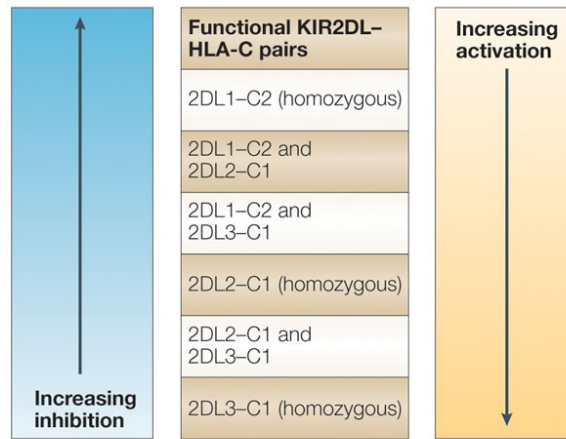
1.4.1.1 Études génétiques

Le rôle potentiel des cellules NK dans la résolution spontanée du VHC a d'abord été démontré par une étude génétique. Cette étude a examiné les KIR et leurs ligands HLA-C dans une cohorte de plus de 1000 individus exposés au VHC. Khakoo *et al* (133) ont démontré que les patients homozygotes pour le KIR2DL3 et son ligand HLA-C1 avaient plus de chances de guérir spontanément de l'infection par le VHC donc étaient protégés contre la persistance du virus. Par ailleurs, l'effet protecteur de cette combinaison de gènes était limité aux individus infectés par l'utilisation de drogues intraveineuses ou par blessure d'une piqûre d'aiguille. Cependant les individus infectés par transfusion sanguine n'étaient pas protégés car il est possible que la réponse immunitaire innée ait été submergée par la quantité élevée d'inoculum. L'association du KIR2DL3 et du HLA-C1 a été subséquemment confirmée dans une petite cohorte d'origine Puerto-Ricaine (134), indiquant que l'effet protecteur est constant au sein de plusieurs populations. Deux autres études ont par la suite démontré que la combinaison du KIR2DL3 et du HLA-C1 était plus fréquente chez un groupe d'utilisateurs de drogues intraveineuses qui demeuraient négatif pour le VHC, ce qui démontre que cette association protège contre l'infection par le VHC (135, 136). De plus, cette même combinaison de gènes a également été décrite comme étant plus fréquente chez les patients ayant guéri de l'infection par le VHC suite au traitement à base d'IFN- α et de ribavirin (136, 137).

Le rôle du KIR2DL3 et de son ligand HLA-C1 dans la protection contre l'infection par le VHC et dans la protection contre l'évolution chronique de l'infection par le VHC, n'est pas bien compris. En effet, le rôle que peut jouer un récepteur qui inhibe l'activité des cellules NK dans la guérison de l'infection par le VHC est difficile à concevoir. Une des hypothèses est que le KIR2DL3 se lie au HLA-C1 avec une plus faible avidité que le KIR2DL2 (138), donc le signal inhibiteur provenant du KIR2DL3 serait plus faible et par conséquent le seuil d'activation serait plus bas (Figure 10).

Une série d'études génétiques ont identifié des polymorphismes à simple nucléotide (SNP de *single nucleotide polymorphisms*) près du gène codant pour l'IL-28B, qui sont significativement associés

avec la résolution spontanée (139) et la résolution induite par traitement (140-142) de l'infection par le VHC. Une autre étude récente a publié que la présence du mauvais allèle T de l'IL-28B (rs12979860) ou de l'allèle KIR2DS3, un récepteur activateur des cellules NK, est associée à la persistance du VHC (143). De plus, la combinaison des deux allèles crée une synergie pour augmenter le risque de persistance du VHC. Cependant, le lien fonctionnel entre l'IL-28B et les cellules NK n'est pas connu et ceci demeure un domaine de recherches intenses.



Nature Reviews | Immunology

Figure 10: Les effets de l'interaction entre les KIR2DL et leurs ligands HLA-C sur le niveau d'activation des cellules NK.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Immunology (144), droit d'auteur 2005.

Légende : Parmi le groupe de récepteurs inhibiteurs KIR2DL, le KIR2DL3 est celui qui se lie à son ligand avec la plus faible avidité. Donc les cellules NK de patients homozygotes pour le KIR2DL3 et le HLA-C1 reçoivent potentiellement des signaux d'inhibition plus faibles donc leur seuil d'activation serait plus bas.

1.4.1.2 Les interactions entre les cellules NK et le VHC

Il a été décrit que le VHC est capable d'inhiber la production d'IFN de type I par les hépatocytes qu'il infecte (145). D'autres chercheurs ont alors examiné si le VHC pouvait aussi inhiber la fonction des cellules NK. Les études initiales utilisant la protéine recombinante de l'enveloppe E2 immobilisée sur une plaque ont démontré que la protéine E2 inhibait la sécrétion de cytokines, la cytotoxicité et la dégranulation des cellules NK (146, 147). Les études subséquentes ont utilisé des virions du VHC afin que la protéine E2 soit exprimée naturellement, et ils ont observé que les virions immobilisés sur une plaque (148) mais pas les virions libres dans le surnageant (148, 149) pouvaient inhiber la fonction des cellules NK. Parallèlement, une autre étude a démontré que la protéine NS5A relâchée par des hépatocytes infectés par le VHC pouvait induire la production de TGF- β par les monocytes et conséquemment diminuer l'expression du récepteur activateur NKG2D par les cellules NK. Cette diminution de l'expression du NKG2D a rendu les cellules NK dysfonctionnelles (150).

Même si les virions et les protéines du VHC semblent pouvoir inhiber la fonction des cellules NK, il est possible que le contact entre les cellules NK et les hépatocytes infectés par le VHC affecte la fonction des cellules NK de façon différente. Une étude récente a en effet observé que le contact entre ces deux types de cellules pouvait inhiber la dégranulation et la production d'IFN- γ par les cellules NK, et que ceci corrélait avec une diminution de l'expression de récepteurs activateurs tels que le NKG2D et le NKp30 (151).

Malgré le fait que le VHC semble pouvoir affecter la fonction des cellules NK, ces dernières sont également capables de contrôler le VHC. Il a été démontré que les cellules NK activées par l'IL-2 ou l'IFN- α mais pas au repos étaient en mesure de lyser des hépatocytes infectés avec un réplicon du VHC. La première étude a conclu que cette lyse était dépendante des perforines et des granzymes, ainsi que du CD81 (152), alors qu'une deuxième étude a observé qu'elle était dépendante du TRAIL (153). De plus, une autre étude a observé que les cellules NK activées par l'IL-2 étaient capables d'inhiber la réplication du VHC dans des hépatocytes infectés. Le mécanisme semblait dépendre de la production d'IFN- γ par les cellules NK et l'induction subséquente d'IFN- α et - β par les hépatocytes (154).

1.4.1.3 Études précédentes sur les cellules NK de patients infectés par le VHC

De nombreuses études ont voulu déterminer si la fréquence, le phénotype et la fonction des cellules NK étaient affectés pendant la phase chronique de l'infection par le VHC. Plusieurs groupes ont démontré que la fréquence des cellules NK CD16⁻CD56^{bright} est augmentée, mais que celles des cellules NK CD16⁺CD56^{dim} est diminuée pendant l'infection chronique par le VHC (155-159). De plus, la sous-population de cellules CD16⁺CD56⁻ qui est dysfonctionnelle semble amplifiée pendant l'infection chronique (160). En résumé, il y a une diminution des cellules NK CD16⁺CD56^{dim} matures et cytotoxiques au profit d'une augmentation de la population CD16⁻CD56^{bright} qui est moins mature et de la population CD16⁺CD56⁻ qui est à un stade avancé de différenciation.

En ce qui concerne le phénotype des cellules NK, le résultat le plus cohérent parmi les nombreuses études est une augmentation de l'expression du récepteur inhibiteur NKG2A (158, 161-163). Cependant, les études examinant l'expression de récepteurs activateurs, notamment le NKG2D et le Nkp46, ont obtenu des résultats contradictoires [révisé dans (164)]. En ce qui a trait aux fonctions de cellules NK, plusieurs études ont démontré que la cytotoxicité est normale ou même augmentée chez les patients chroniquement infectés par le VHC (155, 157, 158, 165-167). De plus, l'expression de TRAIL, un ligand inducteur d'apoptose, par les cellules NK est également augmenté (153, 166). Cependant, des défauts au niveau de la production de cytokines pro-inflammatoires ont été notés par plusieurs groupes. D'abord, une diminution de la production d'IFN- γ par les cellules NK a été démontrée chez les patients chroniquement infectés (165, 166, 168). De plus, une augmentation de la sécrétion de cytokines Th2, tel que l'IL-10 et le TGF- β , par les cellules NK a également été observée (158, 161, 165). Étant donné que l'IFN- γ produite par les cellules NK peut bloquer la réplication du VHC (148, 154, 169) et peut promouvoir la différenciation de cellules effectrices Th1, et que l'IL-10 et le TGF- β sont des cytokines anti-inflammatoires, il est possible que les cellules NK créent un environnement favorable pour la réplication du VHC.

La capacité des cellules NK à moduler les DC a été très peu étudiée dans le contexte de l'infection par le VHC. Une seule étude a démontré que les cellules NK de patients infectés étaient incapables d'induire la maturation de DC (161). Ceci était causé par la forte expression du NKG2A et la production d'IL-10 et de TGF- β par les cellules NK. Ces résultats sont supportés par une autre étude qui

a démontré que des cellules d'hépatomes infectées par le VHC augmentaient l'expression du HLA-E qui est le ligand du NKG2A (162).

1.4.2 Études précédentes sur les DC de patients infectés par le VHC

Puisque les DC jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative, de nombreuses études ont examiné le phénotype et la fonction des DC de patients chroniquement infectés par le VHC. Puisque les DC sont peu fréquentes parmi les PBMC, les études initiales ont plutôt utilisé des DC dérivées de monocytes (MDDC, de *monocyte-derived DC*). Cette méthode consiste à isoler les monocytes et à les différencier en DC *in vitro* pendant quelques jours, et elle permet d'obtenir un plus grand nombre de cellules. Bien que ces études aient donné des résultats contradictoires, la plupart ont démontré que les MDDC de patients chroniquement infectés ont un phénotype normal (170-172), mais une capacité allostimulatoire réduite (173, 174). Cependant, il est possible que les monocytes et les DC ne soient pas affectés de la même façon par le VHC, donc les MDDC ne représenteraient pas nécessairement bien les DC périphériques. Avec le développement de la cytométrie en flux multiparamétrique, les études plus récentes ont été réalisées *ex-vivo* avec des mDC et des pDC périphériques. Il y a un consensus général quant à la fréquence réduite des mDC et pDC pendant l'infection chronique par le VHC (175-177). Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant la fonction des mDC et pDC. Par exemple, plusieurs études ont noté que les mDC de patients chroniquement infectés par le VHC sont défectueux quant à leur capacité à induire une réponse allogénique (177-179), alors que d'autres études n'ont pas confirmé ceci (172, 180). Toutefois, plusieurs études ont démontré que les mDC de patients chroniquement infectés par le VHC produisent moins d'IL-12 qui est pro-inflammatoire, mais plus d'IL-10 qui est anti-inflammatoire (178, 179, 181). De plus, certaines études ont noté que la sécrétion d'IFN- α par les pDC est réduite (177, 178, 182), alors que d'autres ont noté qu'elle est normale (183). Globalement, des mDC et pDC dysfonctionnelles peuvent être détectées chez certains mais pas tous les patients chroniquement infectés par le VHC. La raison pour laquelle toutes ces études ont obtenu des résultats contradictoires n'est pas claire, mais plusieurs facteurs sont probablement en cause, tels que le stimulus utilisé pour activer les DC (cytokines ou ligands de TLR), le génotype du VHC, la durée de l'infection, l'âge et le sexe des patients ou encore la co-infection avec d'autres virus.

D'autres études ont utilisé une approche différente pour déterminer si le VHC affecte la fonction des DC. En vue d'éliminer la variabilité entre les différentes quasi-espèces du VHC présentes chez les patients infectés, ces études ont utilisé un système *in vitro* du VHC afin de déterminer l'effet potentiel du VHC sur des DC d'individus non infectés. Ces essais ont été réalisés avec des protéines du VHC, des particules de type VHC ou des virions du VHC adaptés à la culture cellulaire. Malgré l'élimination de la variabilité du VHC, certaines études ont démontré une diminution de la capacité des DC à induire une réponse allogénique ou à répondre à des ligands de TLR, alors que d'autres études ont observé que la fonction des DC était normale [révisé dans (184)].

La capacité des DC à activer les cellules NK chez les patients chroniquement infectés par le VHC a été peu examinée. Une étude a démontré que les mDC maturées avec de l'IFN- α , mais pas avec du lipopolysaccharide (LPS), étaient incapables d'induire la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité par les cellules NK (108, 185). Par ailleurs, une autre étude a observé que les pDC de patients chroniquement infectés par le VHC activaient les cellules NK de façon semblable aux pDC de contrôles non-infectés (186).

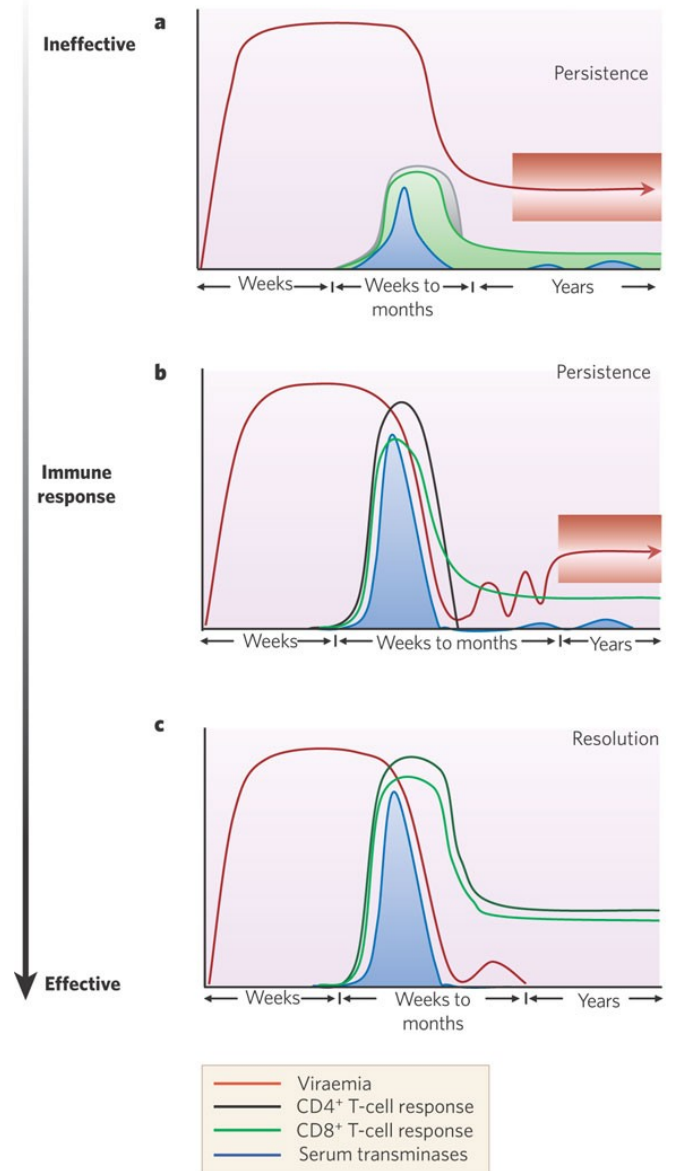
1.5 L'immunité adaptative contre le VHC

De nombreuses études ont démontré que la résolution spontanée de l'infection par le VHC est associée avec une réponse immunitaire forte et soutenue médiée par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Figure 11). De plus, ces lymphocytes T reconnaissent de multiples épitopes parmi les différentes protéines du VHC (6, 187-194) et peuvent persister pendant plusieurs décennies chez les patients ayant résolu spontanément (195). De nombreuses preuves viennent appuyer l'important rôle que jouent les lymphocytes T dans l'élimination du VHC.

Figure 11: La réponse immunitaire adaptative pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature (196), droit d'auteur 2005.

Légende : A) Lorsque la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est faible ou absente, il y a persistance de la virémie. B) Le développement d'une réponse anti-VHC par les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ contrôle partiellement la virémie, mais la perte des lymphocytes T CD4⁺ entraîne la réapparition de la virémie. C) Seule une réponse forte et soutenue médiée par les lymphocytes T VHC-spécifiques contrôle la virémie et entraîne la résolution spontanée.



Premièrement, il existe une corrélation entre la cinétique de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD8⁺ VHC-spécifiques et l'élimination du VHC. En effet, les lymphocytes T CD8⁺ VHC-spécifiques sont détectés en périphérie et dans le foie seulement de 6 à 8 semaines après le début de l'infection et sont temporellement associés avec la résolution spontanée du VHC, mais aussi avec le développement de l'inflammation au niveau du foie (6, 190-192, 194, 197). Deuxièmement, les lymphocytes T CD8⁺ VHC-spécifiques sont en mesure d'éliminer le VHC *in vitro* principalement via la sécrétion d'IFN- γ , mais aussi via la lyse des hépatocytes infectés (169). Troisièmement, il a été démontré que les lymphocytes T CD8⁺ contrôlent la réplication du VHC *in vivo*. Cette étude a procédé à une déplétion des lymphocytes T CD8⁺ chez des chimpanzés infectés expérimentalement par le VHC, et a démontré la persistance du VHC dans ces animaux jusqu'au développement de nouveaux lymphocytes T CD8⁺ VHC-spécifiques (198).

Tout comme les lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes T CD4⁺ VHC-spécifiques contribuent également à la résolution spontanée de l'infection par le VHC. Plusieurs études ont démontré qu'une réponse immunitaire forte et spécifique pour plusieurs épitopes médiée par les lymphocytes T CD4⁺ VHC-spécifiques, n'est pas soutenue pendant l'infection chronique du VHC (187-189, 193, 199, 200). De plus, leur rôle *in vivo* a également été examiné. Cette étude a observé que la déplétion de lymphocytes T CD4⁺ chez les chimpanzés infectés par le VHC entraînait la persistance du VHC (201). Ainsi, les rôles joués par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la résolution du VHC sont complémentaires et tous les deux essentiels.

Plusieurs mécanismes pourraient influencer la faible réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le VHC qui est associée avec la persistance de l'infection par le VHC [révisé dans (202)]. D'abord il a été démontré que des mutations apparaissent dans le génome du VHC et plus particulièrement au niveau d'épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8⁺. Ces mutations permettent au VHC d'échapper à sa reconnaissance par les lymphocytes T et ainsi de persister au sein de l'hôte. De plus, il a été démontré que le développement de lymphocytes T CD8⁺ dysfonctionnels est associé aux infections chroniques par le VHC. Ces lymphocytes T CD8⁺ ont une faible capacité proliférative, une faible sécrétion de cytokines et sont caractérisés par l'expression de molécules « d'épuisement » notamment le PD-1. Cette dysfonction des lymphocytes T CD8⁺ pourrait être causée par l'absence d'aide provenant des lymphocytes T CD4⁺ ou par la présence de signaux

suppresseurs provenant des lymphocytes T régulateurs. Ces différents facteurs seront présentés plus en détails dans la section 6 (conclusion) de la thèse.

La majorité des patients atteints d'une infection aiguë par le VHC développent des anticorps contre diverses protéines du VHC. Par contre, seulement une minorité de ces anticorps sont capables de bloquer l'adhésion, l'entrée ou la décapsidation du VHC. Ces anticorps sont nommés anticorps neutralisant. Leur rôle pendant la phase aiguë et plus particulièrement dans la résolution spontanée de l'infection par le VHC n'est pas bien défini. Plusieurs études suggèrent que l'absence d'anticorps neutralisant pendant la phase aiguë est associée avec la guérison spontanée, alors que le développement de ces anticorps suite à la persistance du virus est associé avec une évolution chronique (203-207). Par contre, d'autres études ont démontré que les anticorps neutralisant se développent pendant la phase aiguë précoce chez la majorité des patients guérissant spontanément (208) et également chez les patients guérissant spontanément d'une réinfection (209). Cependant, si ce sont réellement les anticorps neutralisant qui sont responsables de la résolution spontanée dans ces études, demeure inconnu.

SECTION 2 : HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

La prévalence mondiale de l'infection par le VHC est de 2%, mais elle peut être dix fois plus élevée dans certains pays. Seulement une petite fraction des individus infectés résout spontanément alors que la majorité développe une infection chronique. Il n'existe pas de vaccin prophylactique, et le traitement actuel associé à de nombreux effets secondaires est efficace pour seulement la moitié des patients. Il est donc primordial de déterminer quels sont les facteurs qui contribuent à la résolution spontanée de l'infection par le VHC afin de développer des vaccins préventifs et des traitements alternatifs.

Il est maintenant évident que la réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est importante pour la résolution spontanée de l'infection par le VHC. Une réponse immunitaire par les lymphocytes T CD8⁺ VHC-spécifiques peut être détectée chez les patients chroniquement infectés mais elle est en général faible et cible peu d'épitopes (210, 211). Cependant, il est difficile de savoir si ce sont les lymphocytes T CD8⁺ qui n'ont pas été activés correctement pendant la phase aiguë ou si c'est leur disparition après activation qui est en cause. Des études effectuées chez des chimpanzés infectés expérimentalement par le VHC (6, 190) ou chez des travailleurs de la santé s'étant infectés accidentellement avec des aiguilles souillées (192) ont démontré que les lymphocytes T CD8⁺ VHC-spécifiques semblent induits mais sont peu fonctionnels pendant la phase précoce de l'infection aiguë, du moins chez certains patients. Ceci suggère que les patients chroniquement infectés ont un défaut au niveau de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ VHC-spécifiques pendant la phase aiguë, donc possiblement un défaut au niveau des cellules présentatrices d'antigènes telles que les DC. Étant donné que les cellules NK interagissent avec les DC et qu'elles activent également les lymphocytes T directement, il est également possible qu'un défaut au niveau des cellules NK affecte la réponse immunitaire adaptative subséquente.

Le rôle des cellules NK dans la résolution spontanée du VHC a initialement été suggéré par une étude génétique démontrant que les patients homozygotes pour le KIR2DL3 et son ligand HLA-C1 ont une meilleure chance d'éliminer le VHC. Cependant, le lien fonctionnel n'est toujours pas compris. Tel que décrit dans l'introduction, plusieurs études ont déjà examiné les cellules NK et les DC pendant la phase chronique de l'infection par le VHC. Cependant, étant donné que la résolution spontanée a lieu

pendant la phase aiguë de l'infection, aucune de ces études de la phase chronique ne démontrent le rôle potentiel que peuvent jouer les cellules NK et les DC dans l'activation de la réponse adaptative et l'élimination subséquente du VHC. Au moment où a débuté ce projet de doctorat, aucune étude n'avait examiné les cellules NK et les DC pendant la phase aiguë de l'infection, principalement puisque cette phase est asymptomatique. Quelques études ont été publiées par la suite et seront discutées dans la section 6 (conclusion) de la thèse.

L'hypothèse du projet de doctorat est donc que l'activité des cellules NK pendant la phase aiguë de l'infection au VHC influence la fonction des DC afin que ces dernières puissent déclencher une réponse immunitaire adaptative et générer des lymphocytes T différenciés capables d'éliminer le VHC. Ce projet est composé de trois objectifs :

- 1) Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules NK pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC.** Cet objectif consiste à étudier l'expression de récepteurs inhibiteurs et activateurs par les cellules NK, ainsi que leurs fonctions de cytotoxicité et de production de cytokines. Le phénotype et la fonction des cellules NK ont été examinés chez trois groupes d'individus : 1) patients atteints d'une infection aiguë suivie d'une guérison, 2) patients atteints d'une infection aiguë suivie d'une évolution chronique et 3) individus exposés mais non infectés. Finalement, un suivi longitudinal des cellules NK a également été fait sur trois différents temps d'infection : 1) avant infection, 2) pendant la phase aiguë et 3) pendant la phase chronique ou après résolution. Cette étude peut ainsi permettre de corrélérer l'état des cellules NK avec l'évolution de l'infection au VHC. Ces travaux sont présentés dans la section 3 de la thèse.
- 2) Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des DC pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC.** Ce deuxième objectif s'intéresse à étudier le stade de maturation des mDC et pDC en examinant l'expression de molécules de co-stimulation et de récepteurs de co-inhibition. Il s'intéresse également à étudier la capacité des mDC à produire des cytokines et à engouffrer des antigènes par endocytose. Tout comme l'objectif précédent, les DC ont été étudiées chez des patients atteints d'une infection aiguë suivie d'une guérison ou d'une évolution chronique. Un suivi longitudinal a aussi été effectué sur trois temps d'infection : 1) pendant la phase aiguë précoce, 2) pendant la phase aiguë tardive et 3) pendant la phase chronique ou après résolution. Cette étude peut

ainsi permettre de corréler l'état des DC avec l'évolution de l'infection et potentiellement de faire un lien avec la réponse immunitaire adaptative VHC-spécifique. Ces travaux sont présentés dans la section 4 de la thèse.

3) Caractérisation des interactions entre les cellules NK et les DC pendant l'infection par le VHC.

Ce troisième objectif consiste d'abord à étudier la capacité des cellules NK activées à lyser les DC immatures, donc à éliminer les DC potentiellement tolérogéniques afin de favoriser les DC immunogéniques. Cette étude vise deuxièmement à étudier la capacité des DC matures à activer les cellules NK au repos et à potentialiser leur réponse envers des cellules cibles, en examinant la production de cytokines et la capacité cytotoxique des cellules NK. Cette étude transversale a été effectuée chez des patients atteints d'une infection aiguë, chez des patients ayant résolu spontanément, chez des patients chroniquement infectés et chez des individus exposés mais non infectés. Cette étude va ainsi permettre d'identifier des dysfonctions potentielles au niveau des interactions entre les cellules NK et les DC, et de les corréler avec le stade d'infection par le VHC. Ces travaux sont présentés dans la section 5 de la thèse.

SECTION 3: MANUSCRIT 1

Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses

Journal of Hepatology 2010 vol. 53 j 805–816

Sandy Pelletier^{1,3}, Christian Drouin^{1,3}, Nathalie Bédard¹, Salim I. Khakoo², Julie Bruneau^{1,4}, Naglaa H. Shoukry^{1,5,*}

¹Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital St-Luc, Montréal, QC, Canada; ²Department of Hepatology, Division of Medicine, Imperial College, London, UK; ³Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada; ⁴Département de médecine familiale, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada; ⁵Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

*Corresponding author. Address: Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital St-Luc, 264 Boul., René-Lévesque Est, Local PEA-316, Montréal, QC, Canada H2X 1P1.

Keywords: Innate immunity; Viral hepatitis; Cytotoxicity; Cytokines.

S. Pelletier est responsable de la majorité de la réalisation des travaux de recherche. C. Drouin est responsable en partie des travaux présentés à la fig. 5 et 6. N. Bédard est responsable de travaux non représentés. S. Khakoo est responsable du génotypage des KIR. J. Bruneau a contribué à l'obtention des échantillons cliniques utilisés pour les travaux de recherche. S. Pelletier est responsable de la réalisation

des figures du manuscrit, ainsi que des statistiques. S. Pelletier et N. Shoukry sont responsables de la planification des travaux et de l'écriture de ce manuscrit. N. Shoukry a supervisé l'ensemble de l'étude.

Abstract

Background & Aims: Natural killer (NK) cells provide early defense against viral infections by killing infected cells and producing cytokines that inhibit viral replication. NK cells also interact with dendritic cells (DCs) and this reciprocal interaction regulates both innate and adaptive immunity. Genetic studies have suggested that NK cell activity is a determinant of HCV infectious outcome but a functional correlation has not been established. We hypothesized that increased NK cell activity during acute HCV infection correlates with spontaneous viral clearance.

Methods: We used multiparametric flow cytometry to monitor longitudinally the phenotype and the activity of NK cells in a cohort of intravenous drug users following HCV exposure. Three groups were studied: acute HCV with chronic evolution (n = 13), acute resolving HCV (n = 11), and exposed un-infected individuals (n = 10). We examined the expression of several NK cell-activating and -inhibiting receptors, IFN- γ production and CD107a degranulation upon stimulation, and the kinetics of NK cell responses relative to T cell responses.

Results: We observed decreased expression of the inhibitory NKG2A receptor in NK cells following spontaneous HCV clearance. In addition, we observed increased NK cell degranulation during acute HCV irrespective of infectious outcome. NK cell peak responses preceded or coincided with peak T cell responses. Furthermore, NK cell degranulation correlated with the magnitude of HCV-specific T cells.

Conclusions: Our results demonstrate that NK cells are activated during acute HCV regardless of infection outcome and may play an indirect role through induction and priming of T cell responses.

Abbreviations

DC, dendritic cells

ELISPOT, enzyme-linked immunospot assay

HBV, hepatitis B virus

HCV, hepatitis C virus

HIV, human immunodeficiency virus

ICS, intracellular cytokine staining

IDUs, intravenous drug users

IFN- γ , interferon gamma

NK, natural killer cells

PBMC, peripheral blood mononuclear cells

Introduction

The majority of individuals exposed to hepatitis C virus (HCV) develop persistent infection and chronic liver disease [1]. Acute HCV is characterized by a significant delay in the onset of adaptive T cell responses despite its active viral replication. This suggests a failure of innate immunity to contain viral replication and provide the necessary signals to prime an efficient adaptive immunity critical to spontaneous viral clearance [2,3]. Natural killer (NK) cells are the most important effector population of the innate immune response. Two NK cell subsets can be distinguished based on their differential expression of CD56 and CD16: immunoregulatory $CD3^-CD56^{\text{bright}}CD16^-$ and cytolytic $CD3^-CD56^{\text{dim}}CD16^+$ [4]. NK cells provide an early defense line against viral infections by killing infected cells and producing cytokines that can directly inhibit viral replication and trigger the adaptive immune response. NK cells use inhibiting and activating receptors as a mean of controlling their activity. NK cells interact with dendritic cells (DCs) and this reciprocal interaction results in the regulation of both innate and adaptive immune responses [5,6]. DCs can activate NK cells by binding to NKp30 on the surface of NK cells and by secreting numerous cytokines such as IL-12 [7]. NK cells, in turn, secrete IFN- γ and TNF- α which induce DC maturation and trigger the adaptive immune response [8]. In addition, NK cells can also kill immature DCs and inhibit their capacity to prime or tolerize adaptive T cell responses [5,9].

Two observations highlighted the potential role of NK cells during the early phase of HCV infection. First, HCV surface glycoprotein E2 can bind CD81 on the surface of NK cells and inhibit cytotoxicity and IFN- γ production [10,11]; however, Yoon et al. have recently demonstrated that the exposure of NK cells from healthy donors to *in vitro*-produced HCV virions did not influence their function [12]. Second, genes encoding the inhibitory NK cell receptor killer-cell immunoglobulin like receptor (KIR)2DL3 and its human leukocyte antigen C group 1 (HLA-C1) ligand, directly influence the resolution of HCV infection in individuals homozygous for these genes [13,14]. These observations suggest that the inhibition of NK function during the early phase of HCV may contribute to viral persistence.

Several groups have studied NK cells during chronic HCV infection but the results regarding NK cell frequency, cytotoxicity, cytokine production, and receptor expression are conflicting [15–20]. This

probably reflects the complexity of activating and inhibiting signals that control NK cells. Only one study has compared NK cell function in chronic HCV patients with spontaneous resolvers from a single source outbreak [15]. The authors of the study demonstrated that the frequency of the CD56^{dim} NK cell subset was decreased in individuals with chronic HCV, and that NK cells expressed the NKG2A/C/E receptors at higher frequency [15]; however, the activity of NK cells during acute HCV, when their role would be most prominent, and its correlation with the infectious outcome, were not studied.

In this study, we used multiparametric flow cytometry to monitor longitudinally the phenotypic and functional changes in NK cells from a unique cohort of intravenous drug users (IDUs) at high-risk of HCV infection before and during acute HCV infections that progressed to spontaneous resolution or viral persistence. In addition, we monitored NK cells activity in a group of HCV-exposed but un-infected individuals. We demonstrated that NK cell degranulation is increased during acute HCV, regardless of the infection outcome. We also observed a decline in NKG2A expression in NK cells following spontaneous viral clearance, and CD161 expression in infections progressing to chronicity. Finally, we showed that NK cell response peaks prior to T cell response and that NK cell degranulation correlate with the magnitude of the HCV-specific T cell response, suggesting an indirect role for NK cells in priming adaptive immune responses.

Patients and methods

Study subjects and clinical follow-up

A total of 34 HCV-exposed individuals and 10 normal donors were included in this study. HCV acutely infected subjects were recruited among high-risk IDUs participating in the Montreal Acute HepC cohort study (HEPCO) [21], the methadone treatment, and the Hepatology clinics at St-Luc hospital of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). This study was approved by the institutional ethics committee (Protocols # SL05.014 and SL05.025) and conducted according to the Declaration of Helsinki. All participants signed an informed consent upon enrolment. Acute HCV infection (n = 24) was defined as detection of positive HCV RNA and/or HCV antibodies following a previous negative test in the past 6 months, or a positive HCV RNA with concomitant negative HCV antibodies tests. The mean follow-up interval between the last aviremic and the first viremic time point was 12 weeks (range: 1–25 weeks), and the estimated time of the infection was defined as the median between the last aviremic and the first viremic time point. The duration of the infection was defined as weeks after the estimated time of infection. Spontaneous viral resolution (n = 11) or persistent infection (n = 13) was defined as the absence or presence of HCV RNA at 12 weeks post enrolment. This classification is based on recent Canadian guidelines that recommend IFN therapy to all HCV acutely infected patients if they remain HCV positive by week 12 [22]. All patients included in this study were either ineligible or refused IFN therapy. Their classification as acute or chronic did not change whether they were classified at week 12 or 24. Exposed uninfected (n = 10) are IDUs who have admitted sharing a needle or injection materials with an HCV-infected individual but remained HCV RNA and HCV antibody negative. In this study, three time points were analyzed for each patient representing three phases of HCV infection: pre-infection baseline, acute HCV, and follow-up. Baseline was defined as time before HCV infection or reported needle sharing for exposed un-infected (range: -1 to -22 weeks; mean -10 weeks). Baseline samples were available for eight chronic patients, five spontaneous resolvers, and five exposed un-infected. Acute HCV was defined as 12 weeks (range: 6–17 weeks) post estimated time of infection for HCV-infected individuals, and 4 weeks (range: 0–12 weeks) after needle sharing for exposed uninfected. The follow-up time point was defined as 52 weeks (range: 34–62 weeks) post-estimated time of infection for HCV-infected individuals or 36 weeks (range: 20–56 weeks) after needle

sharing for exposed un-infected. All patients tested negative for human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV).

HCV RNA testing and quantification

Qualitative HCV RNA tests were performed using an automated COBAS Ampli- Prep/COBAS Amplicor HCV test, version 2.0 (sensitivity, 50 IU/ml) (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). HCV genotyping was done using standard sequencing for the NS5B region, and was performed by the Laboratoire de Santé Publique du Québec (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) as part of the clinical follow-up of patients. Additional HCV RNA quantification was performed using an in-house quantitative real-time reverse transcription-PCR assay, as previously described [23].

Flow cytometry antibodies and reagents

Directly conjugated antibodies against the following molecules were used: CD3-Pacific Blue (clone UCHT1), CD16-allophycocyanin (APC)-Cy7 (clone 3G8) or CD16-APC-H7 (clone 3G8), CD56-phycoerythrin (PE)-Cy7 (clone B159), CD107a-PE-Cy5 (clone H4A3), CD158a-fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone HP-3E4), CD158b-FITC (clone CH-L), CD161-PE-Cy5 (clone DX12), NKB1-FITC (clone DX9), NKG2D-APC (clone 1D11), NKp30-Alexa 647 (clone P30-15), and IFN- γ -APC (clone B27) (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA); CD69-PETexas Red (ECD) (clone TP1-55-3), and NKp44-PE (clone Z231) (both from Beckman Coulter, Marseille, France); NKG2A-PE (clone #131411) (from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Live cells were identified using an Aqua Live/Dead fixable dead cell Stain Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's protocol. We have used four phenotypic panels and one functional panel. "Fluorescence minus one" control stains were used to determine background levels of staining. Multiparameter flow cytometry was performed using a standard BD LSR II instrument equipped with blue (488 nm), red (633 nm), and violet (405 nm) lasers (BD Biosciences) to systematically perform seven-color staining using FACSDiva software (BD Biosciences). Compensation was performed with single fluorochromes and BD CompBeads (BD Biosciences). Data files were analyzed using FlowJo software, version 8.6.3 for Mac (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

Multiparametric phenotypic characterization of NK cells

All flow cytometry assays were performed on cryopreserved samples. For phenotypic analysis, $1-2 \times 10^6$ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stained with surface antibodies for 30 min at 4 °C and washed twice in fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1× phosphate-buffered saline [PBS], 1% fetal bovine serum [FBS], 0.02% NaN₃), and fixed in FACS fix buffer (1× PBS, 1% formaldehyde).

Intracellular cytokine staining (ICS) and CD107a degranulation assay

PBMCs (2×10^6) were incubated with anti-CD107a antibody and either culture medium as a negative control, or K562 leukemia target cell line (ATCC, Manassas, VA, USA) at 37 °C in R-10 medium (RPMI medium [Invitrogen, Carlsbad, CA, USA] supplemented with 10% FBS). Following 1 h of stimulation, 10 µg/ml of brefeldin A (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 6 µg/ml of monensin sodium salt (Sigma–Aldrich) were added, and cells were then incubated for a total of 6 h. Cells were washed with FACS buffer, stained for viability and cell surface antigens, then permeabilized using BD Cytotfix/Cytoperm solution (BD Bioscience). Cells were then stained with anti-IFN-γ antibody for 30 min, washed twice in BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and fixed in FACS fix buffer. For analysis, cells were gated on viable CD3⁺CD56^{bright}CD16⁻, and CD3⁺CD56^{dim}CD16^{+/lo} NK cells (Fig. 1A). Percent-specific expression is calculated as the background-adjusted function in the presence or absence of target cell line.

IFN-γ ELISPOT

HCV-specific T cell responses were measured 3 weeks (range: 0–14 weeks) after the NK cell responses were measured (12 weeks; range: 6–17 weeks after estimated time of infection). Ninety six-well polyvinylidene difluoride-backed microtiter plates (Millipore, Bedford, MA, USA) were pre-wet with 35% ethanol (15 µl/well) for 1 min, washed with PBS, and coated overnight at 4 °C with 100 µl/well (3 µg/ml) of anti-IFN-γ capture mAb (BD Biosciences). Plates were washed with PBS and blocked for 2 h at 37 °C with 200 µl/well of R-10 medium. Cryo-preserved PBMCs were thawed quickly in a 37 °C water bath and washed in R-10 medium. PBMCs/well (2×10^5) were stimulated, in duplicate, with the various peptides pools at a final concentration of 3 µg/ml of each peptide, in AIM-V-HS

medium (AIM-V complete medium [Invitrogen], 2% Human Serum AB [Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada]) for 36 h at 37 °C, 5% CO₂. Patients were stimulated with 11 peptide pools spanning the entire HCV polyprotein or 3 pools spanning the HCV Core and NS3 proteins and corresponding to HCV genotype 1a (H77 sequence) or genotype 3a (K3a/650 sequence), according to patient's infecting HCV genotype. Patients infected with other HCV genotypes as well as exposed un-infected were stimulated with peptides corresponding to HCV genotype 1a (H77 sequence). Peptides were obtained from the Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository (BEI Resources, Manassas, VA, USA). At the end of the incubation period, plates were washed with PBS-T (PBS 0.05%, Tween-20) then incubated with biotinylated anti-IFN- γ antibody (clone 250 4S.B3) (BD Biosciences) at 0.5 μ g/ml in PBS/0.5% BSA for 2 h at room temperature. Plates were washed and incubated with Streptavidin-Alkaline Phosphatase conjugate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (1:1000) in PBS/0.5% BSA for 1 h at room temperature. Spots were developed using Alkaline Phosphatase conjugate substrate kit (Bio-Rad Laboratories) for 5 min and stopped using tap water. Spots were counted using an Immunospot Analyzer Instrument (Cellular Technology Ltd. [CTL], Shaker Heights, OH, USA). PBMCs incubated with media alone served as negative controls. Positive controls were: PMA (phorbol myristate acetate [Sigma-Aldrich]) 50 ng/ml – Ionomycin (Sigma-Aldrich) 1 μ g/ml, and a control peptide pool CEF (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Germantown, MD, USA) at 0.5 μ g/ml. Specific Spot forming cells (SFC) were calculated as “mean number of spots in test wells - mean number of spots in media control wells” and normalized to SFC/10⁶ PBMCs. A response was scored positive if greater than 50 SFC/10⁶ PBMCs.

Statistical analysis

Comparisons between patient groups with HCV chronic evolution, spontaneous resolution, and exposed un-infected, during baseline, acute, and follow-up phases of infection, were evaluated by two-way ANOVA (repeated measures). Data were analyzed with SigmaStat 3.5 for Windows (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA). Comparisons between HCV chronic evolution, spontaneous resolution, exposed un-infected, and healthy donors were evaluated by one-way ANOVA. Correlations were evaluated by Pearson's test if data passed normality test or by Spearman's test if data did not pass normality. Comparisons between groups of patients bearing certain KIR and HLA genes were evaluated

by the two-tailed t-test for independent samples, or one-way ANOVA if more than two groups. Data were analyzed with GraphPad Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Acute HCV infection is associated with increased NK cell degranulation

Thirty-four HCV-exposed IDUs and 10 normal healthy donors were studied. As described in Patients and methods, three patient groups were identified based on outcome following HCV exposure: (a) patients developing acute HCV with chronic evolution (n = 13); (b) patients with acute resolving HCV (n = 11), and (c) HCV-exposed un-infected who remained HCV RNA and anti-HCV antibody negative (n = 10). Patients' demographics and characteristics are listed in Table 1. First, we monitored longitudinally the frequency of the two NK cell subsets $CD56^{\text{dim}}CD16^+$, and $CD56^{\text{bright}}CD16^-$. NK cell-gating strategy by flow cytometry is shown in Fig. 1A. The frequency of the $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ NK cell subset was decreased in all patient groups as compared to healthy donors (Fig. 1B) but it did not change significantly within each group relative to the phase of HCV infection. Similarly, no changes were observed in the frequency of $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ NK cell subset following HCV exposure in any of the groups studied (Fig. 1C). Next, we studied the functional capacity of NK cells following HCV exposure. We monitored the cytokine production and cytotoxic potential of the two NK cell subsets by analyzing IFN- γ production by ICS, and expression of CD107a, a degranulation marker that is indicative of the cytotoxicity of NK cells [24] in response to co-culture with the classical NK cell target K562 cells. Representative staining and gating strategies are presented in Supplementary Fig. 1. The frequency of total CD107a and IFN- γ positive NK cells, as well as NK cells single positive for either CD107a or IFN- γ or double positive for both functions, was evaluated. We did not observe any changes in the frequency of total degranulating (% CD107a $^+$) NK cells between patient groups or time points (Supplementary Fig. 2A and B). In contrast, we observed increased degranulation of the $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ subset in chronics during acute HCV and follow-up, as compared to baseline (Fig. 2A). Similarly, there was a trend towards increased degranulation of the $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ subset in the same patients. Such increase was statistically significant when compared to exposed un-infected and healthy donors (Fig. 2B). Furthermore, we observed a statistically significant increase in degranulation of $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ in spontaneous resolvers during acute HCV as compared to their baseline (Fig. 2B). When the results were stratified by patient, we continued to observe increased degranulation for the majority of individual patients with HCV chronic evolution (Fig. 2C and D) and spontaneous resolution (Fig. 2E and F).

Altogether, these results demonstrate increased NK cell degranulation during acute HCV infection regardless of infection outcome.

Reduced IFN- γ production in HCV-infected IDUs

We examined the frequency of total IFN- γ^+ (Supplementary Fig. 2C and D), single CD107a⁻IFN- γ^+ producing cells (Fig. 3A), and CD107a⁺IFN- γ^+ double positive cells (Fig. 3B) in different NK cell subsets following stimulation with K562 cells. We observed a general trend of decreased frequency of IFN- γ producing cells in all chronics and spontaneous resolvers at all time points, as compared to healthy donors (Supplementary Fig. 2 and Fig. 3A and B). The exposed un-infected group demonstrated an intermediate level of IFN- γ production. In one comparison, we observed an increased CD107a⁻IFN- γ^+ frequency in exposed un-infected subjects within the CD56^{dim}CD16⁺ NK subset compared to chronics during the follow-up phase (Fig.3B). Nevertheless, the trend was always towards lower IFN- γ production as compared to healthy donors suggesting that opioid usage may influence the cytokine production capacity of NK cells [25,26]. Finally, as illustrated in Fig. 3C and D, the frequency of NK cells positive for both functions (CD107a⁺IFN- γ^+) was decreased in all the three groups of patients compared to healthy donors during the follow-up phase. This decrease was only observed in the CD56^{bright}CD16⁻ NK cell subset (Fig. 3C). The frequency of CD107a⁺IFN- γ^+ remained unchanged overtime within the CD56^{dim}CD16⁺ NK cell in all groups and was comparable to the frequencies observed in healthy donors (Fig. 3D). These data suggest dissociation in NK cell functions where IFN- γ production does not follow the same trend as degranulation. Furthermore, they suggest that opioid usage may influence the cytokine producing capacity of NK cells.

Longitudinal phenotypic analysis of the expression of activating and inhibiting receptors by NK cells during acute HCV

To determine whether increased NK cell activity during acute HCV is related to changes in expression of activating or inhibiting receptors on their surface, we monitored such longitudinal changes in expression of the activation marker (CD69), the NK cell activating receptors (NKG2D, NKp30, and NKp44), and the NK cell inhibiting receptors (CD161, NKG2A, KIR2DL1/S1, KIR2DL2/L3/S2, and KIR3DL1) on NK cells directly *ex vivo* following HCV exposure. Representative staining for each

marker is presented in Supplementary Figs. 3 and 4. As illustrated in Fig. 4A and B, we observed decreased expression of the activation marker CD69 on both NK cell subsets in chronics and spontaneous resolvers at all time points studied, as compared to healthy donors. Analysis of the frequency of NKG2A⁺ NK cells revealed decreased expression of this receptor by the CD56^{bright}CD16⁻ NK cell subset following HCV viral clearance (Fig. 4C). In addition, we observed decreased frequency of CD161⁺CD56^{dim}CD16⁺ NK cells during baseline and follow-up phases in patients with chronic evolution compared to healthy donors (Fig. 4D). We observed no significant difference in the expression of NKG2D, NKp30, NKp44, KIR2DL1/S1, and KIR2DL2/L3/S2 between the different groups of patients or between the different HCV infection phases studied (data not shown). These results reflect the complexity of the inhibitory and activating signals governing NK cell activity. They suggest that decreased expression of NKG2A might be predictive of HCV spontaneous clearance while decreased expression of CD161 might be predictive of chronic evolution.

NK cell peak precedes or overlaps with peak HCV-specific T cell responses

To characterize the kinetics of induction of innate NK cell responses relative to adaptive T cell responses during acute HCV, NK cell, and T cell activity were monitored longitudinally in 12 acutely infected patients (six spontaneous resolvers and six chronics). NK cell activity was measured by degranulation of the CD56^{dim}CD16⁺ NK cell population or IFN- γ production by the CD56^{bright}CD16⁻ NK cell population; and T cell responses were measured by IFN- γ secretion in response to overlapping HCV peptides spanning the immunodominant HCV core and NS3 proteins [27–30] using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. For four out of the six spontaneous resolvers (patients R1–R4), the peak NK cell response preceded or overlapped the peak T cell response (Fig. 5A). In patient R5, although the highest NK cell activity was at the earliest time point tested, and T cell responses peaked afterwards, the lack of early samples makes it difficult to ascertain whether the peak NK cell response was not missed. Finally, patient R6 was the only spontaneous resolver for whom we observed peak NK cell response after the peak T cell response. For the patients with chronic evolution (Fig. 5B), two out of the six individuals (C1 and C2) had a peak NK cell response before the peak T cell response, three patients (C3–C5) had coinciding response peaks, and one patient (C6) had a peak NK cell response after the peak T cell response. In conclusion, for the majority of HCV-infected patients, the NK cell response developed before the T cell response.

NK cell activity does not correlate with the decline in HCV viral load

As observed in Fig. 5A and B, although the peak NK cell activity preceded T cell responses, it did not induce any major changes in viral load in particular in the patients with chronic evolution (Fig. 5B). To determine if NK cell activity may contribute to decreasing HCV plasma viral load, HCV RNA viral load was quantified, by real-time RT-PCR, in plasma of all patients with HCV chronic evolution and spontaneous resolution during the acute phase. No correlation was established between the highest viral load during acute HCV and NK cell degranulation or IFN- γ production (data not shown). It is important to note that HCV RNA, measured in the majority of spontaneously resolved patients, was below the level of quantification, which may have affected the analysis. Further analysis is needed at the early stages of HCV infection to elucidate this point.

NK cell degranulation correlates positively with the magnitude of HCV-specific T cell responses

NK cells can interact with DCs and the cross-talk between these two cell types regulates both the innate and adaptive immune responses [6]. We sought to determine whether NK cell activity can affect the induction of adaptive immune responses irrespective of infectious outcome. We examined the correlation between NK cell activity measured by degranulation or cytokine production and the magnitude of the HCV-specific T cell response during acute HCV. T cell responses were measured by IFN- γ ELISPOT in response to overlapping HCV peptide pools spanning the entire HCV polyprotein. Results for patients with HCV chronic evolution and spontaneous resolution are shown in Fig. 6. In the exposed uninfected group, only one out of the 10 patients had a detectable ELISPOT response above background levels and was not considered in this analysis. We observed a positive correlation between the frequency of CD107a⁺IFN- γ ⁻ CD56^{dim}CD16⁺ NK cells and the magnitude of the HCV-specific T cell response (Fig. 6A and B). A similar trend was observed for total CD107a⁺ but did not reach statistical significance (Supplementary Fig. 5). In contrast, we observed a negative correlation between the frequency of CD107a⁻IFN- γ ⁺ CD56^{bright}CD16⁻ NK cells and the HCV-specific T cell response (Fig. 6C and D). A similar trend was also observed for total IFN- γ ⁺ but did not reach statistical significance (Supplementary Fig. 5). Moreover, there was no correlation between the frequency of CD107a⁺IFN- γ ⁺ NK cells and ELISPOT data (Fig. 6E and F). These correlations remained unchanged even after excluding one outlier patient (spontaneous resolver) with a T cell response of ~4000 spot forming cells

(SFC)/million PBMCs (data not shown). These results demonstrate a dichotomy between the two NK cell functions and suggest that NK cell degranulation but not IFN- γ production is a more critical parameter in the cross-talk between the innate and adaptive immunity at least during acute HCV.

Discussion

We have analyzed the longitudinal evolution of the NK cell phenotype and the function during acute HCV infections in a unique cohort of IDUs with either spontaneous resolution or chronic evolution. Furthermore, we have examined NK cell activity in a cohort of HCV-exposed but un-infected high-risk IDUs. Although HCV exposure is self reported and might not be completely accurate, this group served as an important control of the influence of drug use on the activity of NK cells. A variable pattern of expression of activating and inhibiting receptors was observed, reflecting the complex signals involved in activation of NK cells. We have demonstrated that NKG2A expression is down regulated following spontaneous viral clearance while expression of CD161 is decreased in persistent viremia, suggesting that NKG2A can be predictive of spontaneous resolution and CD161 can be predictive of chronic evolution. We have shown increased NK cell activity during acute HCV, as demonstrated by increased degranulation. Furthermore, we have demonstrated that the peak NK cell activity precedes or coincides with peak T cell responses. Finally, NK cell degranulation correlated positively, while IFN- γ production correlated negatively with the magnitude of HCV-specific adaptive T cell responses.

Similar to the previous reports that have studied NK cell function during chronic HCV [15,17,19], we have demonstrated that CD56^{dim}CD16⁺ NK cells are significantly depleted in HCV-infected patients as compared to healthy donors and irrespective of acute infection outcome. Depletion of this NK cell subset could result from persistent stimulation and differentiation into activated CD56^{bright} cells [31]; although more recent studies suggest that CD56^{bright} NK cells differentiate into CD56^{dim} NK cells [32,33]. Indeed, we have not observed any increase in the frequency of CD56^{bright} NK cells or in the ratio of CD56^{dim}/CD56^{bright} in any of the patient groups or phases studied (data not shown). The reduced survival of CD56^{dim} NK cells or the enhanced NK cell migration from the blood to the liver could also explain this depletion, although several studies have demonstrated that the total NK cell number in the liver is normal [34] or even decreased [35,36] during HCV infection.

We have shown that NK cell degranulation is increased during acute HCV irrespective of acute HCV outcome towards chronic evolution or spontaneous resolution. However, we have demonstrated that NK cells from chronic patients degranulate more, but NK cells from all HCV-infected individuals produce less IFN- γ as compared to healthy donors and exposed uninfected donors. These results indicate

that NK cells are activated during acute HCV infection and suggest a dichotomy or dissociation between NK cell degranulation and cytokine production functions. Indeed, recent studies have demonstrated that NK cells in chronic HCV patients are polarized towards cytotoxicity [37,38] and that this polarization is likely due to *in vivo* stimulation by IFN- α induced by HCV infection.

Reduced NK cell IFN- γ production in HCV-infected patients could be explained by two mechanisms. First, HCV surface glycoprotein E2 has been shown to bind to CD81 on the surface of NK cells and inhibit cytotoxicity and IFN- γ production [10,11]. Although it is an interesting possibility, it would not explain the low IFN- γ production during baseline. Furthermore, another study by Yoon et al. [12] has recently reported that exposure of NK cells from healthy donors to *in vitro*-produced HCV virions did not influence their function. Another possible explanation for low IFN- γ production by NK cells, in this particular cohort, is opioid abuse. It has been reported that heroin abuse can reduce NK cell activity [25,26]. Specific opiate receptors are expressed on immune cells that may modulate their functions. Indeed, morphine and its derivatives interact with the mu receptor expressed on various immune cell types including lymphocytes and NK cells. Multiple *in vitro* and *in vivo* experiments have demonstrated that it can suppress the production of cytokines and the proliferation of lymphocytes and inhibit NK cell activity in humans, monkey, and rodents [39–41]. Drug abuse in our cohort of HCV-exposed IDUs could account for low IFN- γ production during baseline. Interestingly, exposed uninfected IDUs exhibit an intermediate level of IFN- γ production that is higher than the chronic HCV-infected IDUs in some instances but lower than normal donors in other instances, suggesting that drugs may influence NK cell activity, although are not likely to be the only factor.

Expression of the early activation marker CD69 is decreased on NK cells from HCV-infected patients with chronic evolution and spontaneous resolution but intermediate on exposed uninfected individuals. This decrease was observed during baseline, acute, and follow-up phases, basically reflecting the same pattern as IFN- γ production. Indeed, CD69 expression positively correlated with CD107a⁺IFN- γ ⁺ and CD107a⁺IFN- γ ⁺ but negatively correlated with CD107a⁺IFN- γ ⁻ (data not shown). The fact that HCV E2 glycoprotein has also been shown to decrease the expression of the activation marker CD25 [10] on NK cells, further supports a direct inhibitory *in vivo* mechanism by HCV viral particles.

We have shown that the inhibitory receptor NKG2A is expressed at normal levels in HCV chronic patients. This is in contrast with other studies that have demonstrated that NKG2A is upregulated on NK cells during chronic HCV [18,42] and that this correlates with increased necro-inflammatory score in the liver [43] and increased IL-10 production by NK cells [44]. It is possible that this up-regulation is related to the development of chronic liver disease. Most of the patients in our cohort were followed for less than a year and had not developed any serious liver disease or inflammation as compared to more than 20 years of chronic infection analyzed in other studies [15]. Interestingly, we have also demonstrated that expression of NKG2A on NK cells is down regulated following spontaneous viral clearance. This probably reflects a shut-off mechanism to guard against liver inflammation and development of immune suppressive IL-10 NK cells. It was demonstrated that HCV-infected hepatocytes express enhanced levels of HLA-E, and that the HLA-A2 restricted epitope HCV core AA (35–44) stabilizes HLA-E expression [18]. Since NKG2A binds to HLA-E, enhanced expression of NKG2A by NK cells from chronic HCV patients resulted in reduced cytolysis of HLA-E expressing hepatocytes [18]. Reduced expression of NKG2A by spontaneous resolvers in our study could be a mechanism for these patients to escape cytotoxic impairment induced by HLA-E expressing infected hepatocytes. We have also shown low frequencies of CD161 expressing NK cells in HCV chronically infected patients. CD161 is another inhibitory receptor that was found to be expressed at low frequencies by NK cells of HIV chronically infected patients [24]. These results suggest that low CD161 expression might be associated with chronic HCV and possibly other viral infections.

It has been reported that genes encoding the inhibitory NK cell receptor KIR2DL3 and its HLA-C1 ligand directly influence the resolution of HCV infection in individuals homozygous for these genes [13]. Because of the limited number of patients homozygous for KIR2DL3 and HLA-C1, it was impossible to establish a statistically significant correlation between these genes and increased NK cell activity. In addition, the heterogeneous population studied, composed of HCV-infected patients with chronic evolution or spontaneous resolution, and exposed un-infected, may also have influenced our results. The analysis of NK cell activity in a much larger and homogenous group of HCV-infected individuals will be essential to elucidate this point in future studies.

Here, we have characterized the kinetics of the changes in NK and HCV-specific T cell function during acute HCV and have demonstrated that the peak NK cell response, measured by degranulation or

IFN- γ production, precedes the peak T cell response, measured by ELISPOT, for the majority of HCV chronics and spontaneous resolvers. These results suggest that NK cells could represent the dominant cytolytic effector population during early HCV infection.

We have shown that NK cell degranulation, a surrogate measure of cytotoxicity [45], correlates with the magnitude of the HCV-specific T cell response measured by ELISPOT. It is possible that killing of HCV-infected hepatocytes by NK cells during acute HCV would decrease viral load and allow for the development of an efficient adaptive immune response. However, this possibility is limited since NK cell activity did not correlate with viral load. It is more likely that destruction of HCV-infected hepatocytes by NK cells facilitates the uptake of apoptotic bodies by migratory DCs and enhances antigen transfer to the lymph nodes and priming of HCV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Indeed, a recent study in mice has reported that NK cell-mediated killing of target cells triggers antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell-mediated and humoral responses [46]. In addition to killing infected and cancerous cells, NK cells can also kill immature DCs [9,47]. Killing of immature DCs presenting HCV antigens could limit the development of tolerized adaptive T cell responses and favor the development of antiviral T cells, a process known as DC editing [6].

We have observed a negative correlation between NK cell IFN- γ production and the magnitude of the HCV-specific T cell response. This was a surprising result as IFN- γ is important for inducing the maturation of DCs. However, it has been shown that production of TNF- α by NK cells is more potent than IFN- γ at inducing DC maturation [8]. Correlation between the production of TNF- α by NK cells and the magnitude of HCV-specific T cell responses will need further investigation. In addition, the effect of IFN- γ is more local in the immuno-tolerant environment of the liver and this may not enhance antigen presentation and might be neutralized by several other tolerizing signals and mediators (e.g. IL-10) [48,49].

In conclusion, we propose that NK cells are activated during acute HCV regardless of infection outcome. This suggests that NK cell activity might not be directly implicated in HCV clearance. However, NK cells may play an indirect role through enhanced transfer of HCV antigens to lymph nodes and induction of T cell responses. Because of the well-described NK–DC crosstalk, it is also tempting to speculate that NK cells might edit DCs presenting HCV antigens by inducing DC maturation or killing

immature DCs with tolerogenic potential and thus favor the generation of an optimal antiviral T cell response.

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgements

We thank Robert Boileau for instrumental help with the statistical analysis and Hassen Kared for critical reading of the manuscript. This study was supported by grants from the Dana Foundation, the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (MOP-74524) and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI). S. Pelletier is the recipient of a Ph.D. scholarship from the National Canadian Research Training Program on Hepatitis C. J. Bruneau holds a senior clinical research award from FRSQ. N.H. Shoukry holds a joint New Investigator Award from the Canadian Foundation for Infectious Diseases and CIHR.

Figures and Table

Table I^{m1}: Demographics and Characteristics of patients and donors.

	n	Gender (% M)	Age (median yr)	Race (caucasien)	Genotype 1/2/3
HCV chronic evolution	13	92%	32	11/13	2/0/8
HCV spontaneous resolution	11	63%	27	8/11	1/2/4
Exposed un-infected	10	70%	39	9/10	N/A
Healthy donors	10	60%	31	7/10	N/A

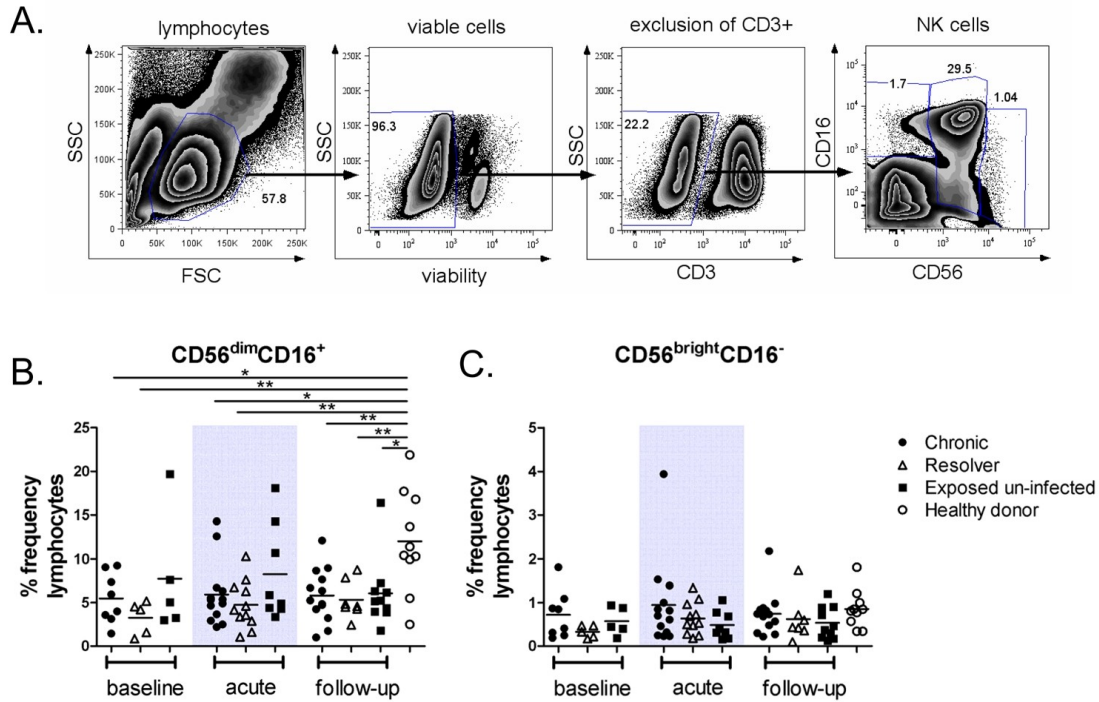


Figure 1^{m1} : No change in frequency of CD56^{dim}CD16⁺ NK cells following HCV exposure.

(A) Strategy for gating on the two NK cell subsets by flow cytometry: viable lymphocytes CD3⁻CD56^{dim}CD16⁺ and CD3⁻CD56^{bright}CD16⁻. Frequency of (B) CD3⁻CD56^{dim}CD16⁺ NK cells and (C) CD3⁻CD56^{bright}CD16⁻ NK cells was determined *ex vivo* in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (Δ), exposed un-infected (■), and healthy donors (○). The acute phase of HCV infection is represented by the shaded area. Mean is represented by a horizontal bar. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors).

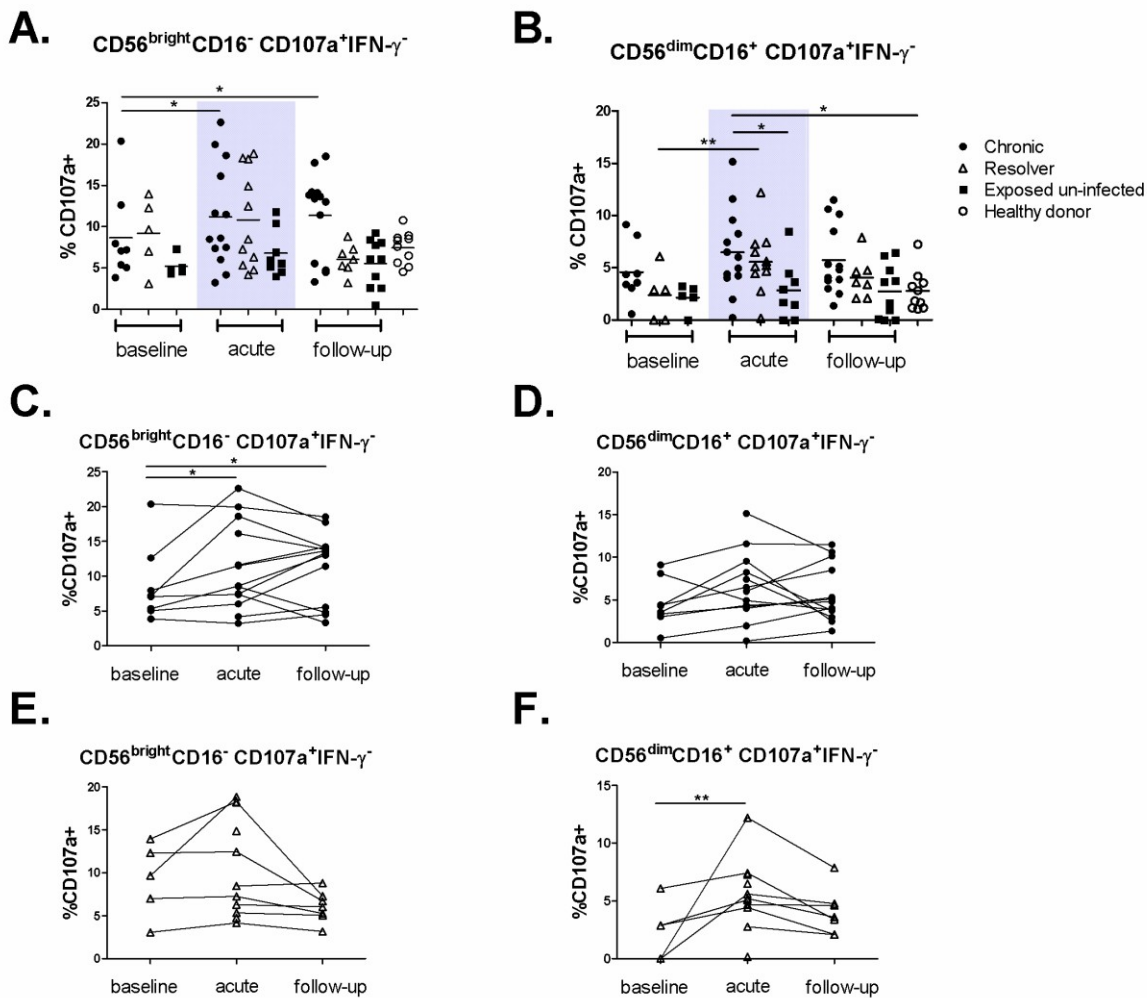


Figure 2^{m1} : Acute HCV infection is associated with increased NK cell degranulation regardless of infection outcome.

Degranulation was measured by CD107a surface staining in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (▲), exposed un-infected (■) and healthy donors (○). PBMCs were co-cubated with or without K562 target cells. Background expression of CD107a was subtracted from expression with target cells. (A and B) Frequency of CD107a⁺IFN-γ⁻ cells gated on (A) CD56^{bright}CD16⁻ NK cells, and (B) CD56^{dim}CD16⁺ NK cells. (C and D) Longitudinal changes in frequency of CD107a⁺IFN-γ⁻ cells represented for each individual patient in the HCV chronics group (●) gated on (C)

CD56^{bright}CD16⁻ NK cells, and (D) CD56^{dim}CD16⁺ NK cells. For each individual patient, different infection time points are joined by a line. (E and F) Longitudinal changes in the frequency of CD107a⁺IFN- γ ⁻ cells in individual patients in the spontaneous resolvers group (Δ) gated on (E) CD56^{bright}CD16⁻ NK cells, and (F) CD56^{dim}CD16⁺ NK cells. For each individual patient, different infection time points are joined by a line. The acute phase of HCV infection is represented by the shaded area. Mean is represented by a horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors).

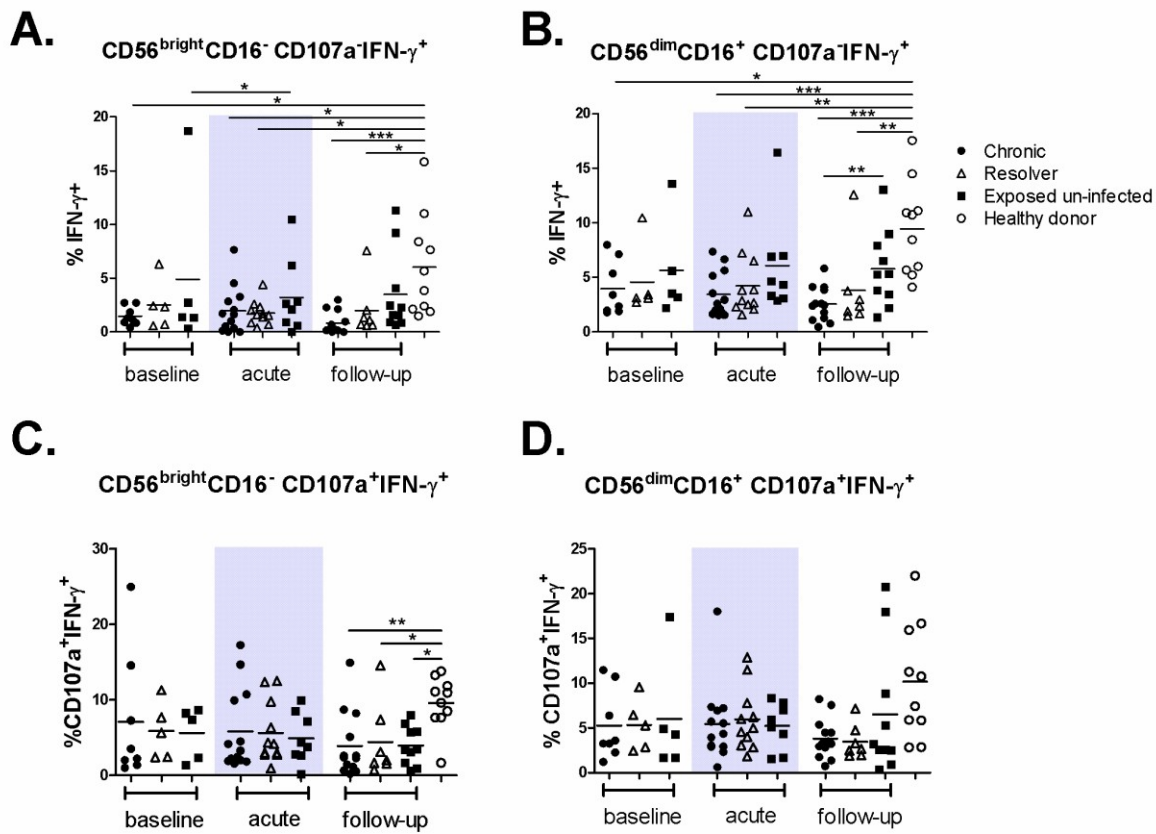


Figure 3^{m1}: HCV infection is associated with decreased IFN- γ regardless of infectious outcome.

Cytokine production was measured by intracellular IFN- γ in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (△), exposed un-infected (■) and healthy donors (○). PBMCs were co-cubated with or without K562 target cells. Background expression of IFN- γ was subtracted from expression with target cells. (A and B) Frequency of $CD107a^{+}IFN-\gamma^{+}$ cells gated on (A) $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK cells, and (B) $CD56^{dim}CD16^{+}$ NK cells. (C and D) Frequency of $CD107a^{+}IFN-\gamma^{+}$ cells gated on (C) $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK cells, and (D) $CD56^{dim}CD16^{+}$ NK cells. The acute phase of HCV infection is represented by the shaded area. Mean is represented by a horizontal bar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors).

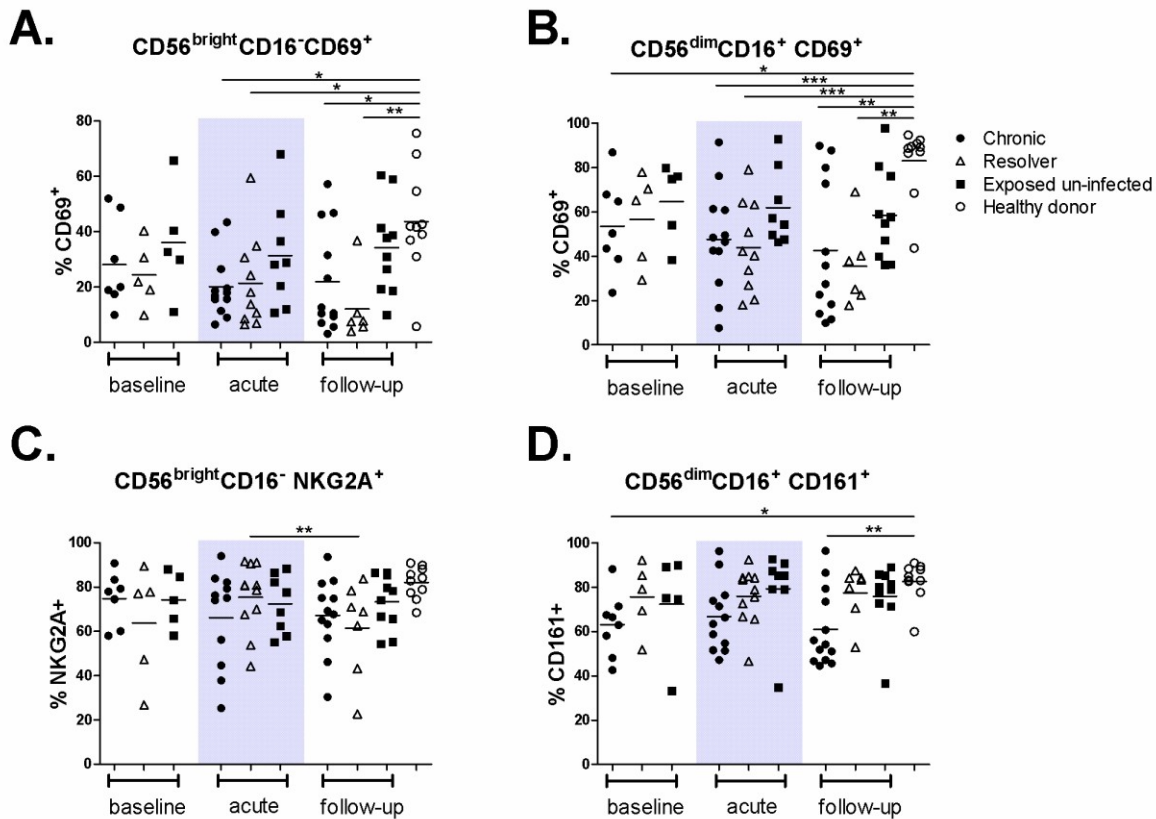


Figure 4^{m1}: Expression of activation markers, activating receptors and inhibitory receptors by NK cells.

Expression of phenotypic markers by NK cells was determined *ex vivo* in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (△), exposed un-infected (■) and healthy donors (○). (A and B) Frequency of $CD69^{+}$ cells gated on (A) $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK cells and (B) $CD56^{dim}CD16^{+}$ NK cells. (C) Frequency of $NKG2A^{+}$ cells gated on $CD56^{bright}CD16^{-}$. (D) Frequency of $CD161^{+}$ cells gated on $CD56^{dim}CD16^{+}$ NK cells. The acute phase of HCV infection is represented by the shaded area. Mean is represented by a horizontal bar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Two way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors).

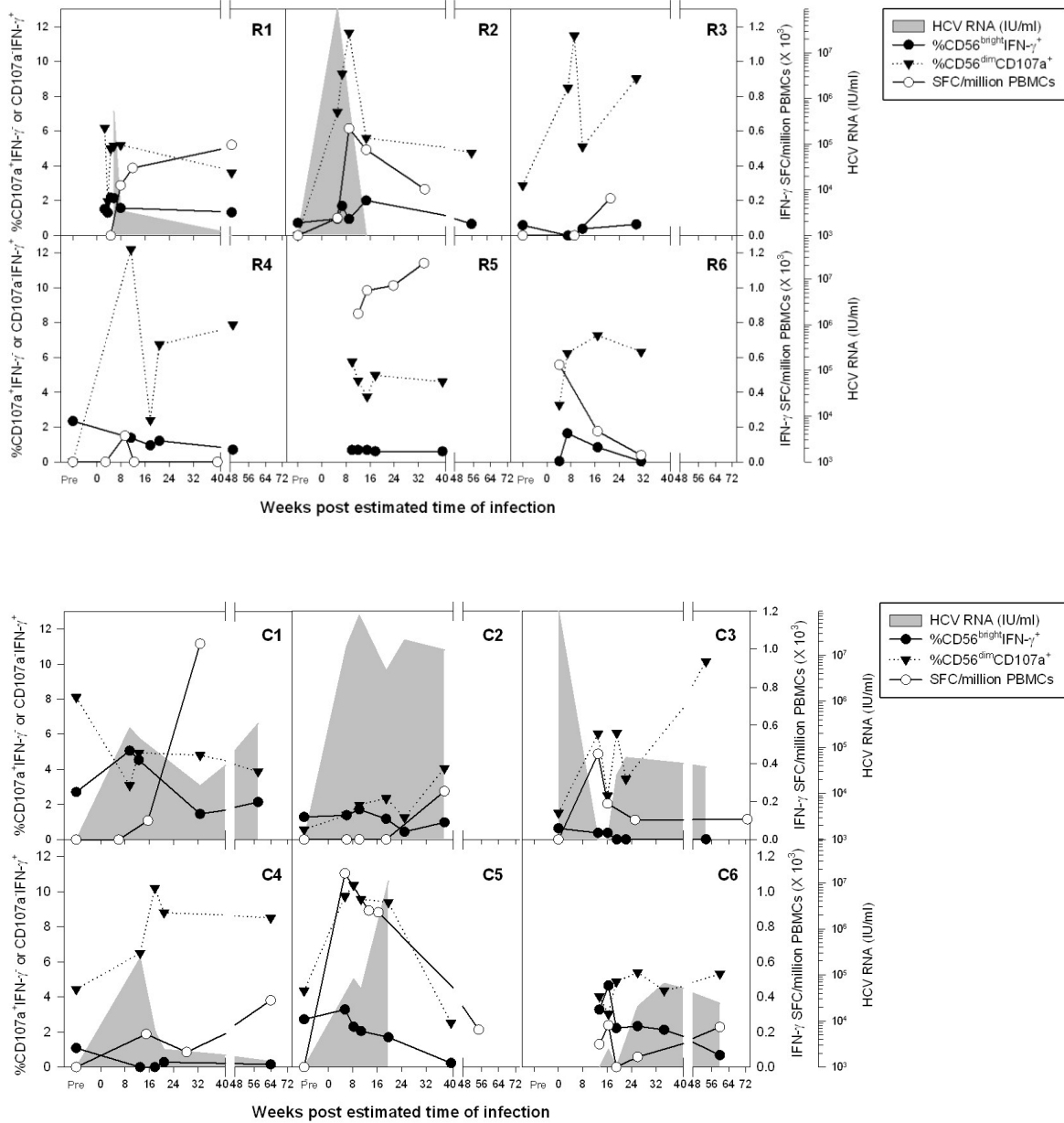


Figure 5^{m1}: NK cell peak precedes or coincides with peak HCV-specific T cell responses.

NK cell activity was measured by degranulation of the $CD56^{dim}CD16^{+}CD107a^{+}IFN-\gamma^{-}$ NK cell population or $IFN-\gamma$ production by the $CD56^{bright}CD16^{-}CD107a^{-}IFN-\gamma^{+}$ NK cell population, and T cell responses, measured by $IFN-\gamma$ secretion in response to overlapping HCV peptides spanning the

immunodominant HCV core and NS3 proteins [27–30] using the ELISPOT assay, were measured longitudinally in a subset of HCV acutely infected patients with either (A) spontaneous resolution (n = 6), or (B) chronic evolution (n = 6). Plasma HCV viral load was measured by an in-house real-time PCR assay (sensitivity 1000 IU/ml) and represented as the grey area in the graph. For patients R3–R6, HCV RNA was below the sensitivity of our assay. Patients R3 and R6 were HCV RNA+ by qualitative PCR (sensitivity 50 IU/ml) at acute HCV diagnosis and negative afterwards. Patient R4 was never HCV RNA+, acute HCV was diagnosed based on a positive anti-HCV antibody test following a previous negative test within a 16 week interval. Patient R5 was HCV RNA+ by qualitative PCR (sensitivity 50 IU/ml) at acute HCV diagnosis and the first time point tested then negative afterwards. Patient C5 tested HCV RNA+ by qualitative PCR (sensitivity 50 IU/ml) at all time points studied but samples were not available for viral load quantification.

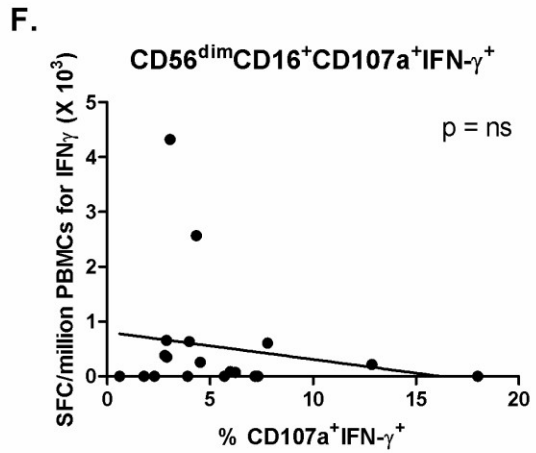
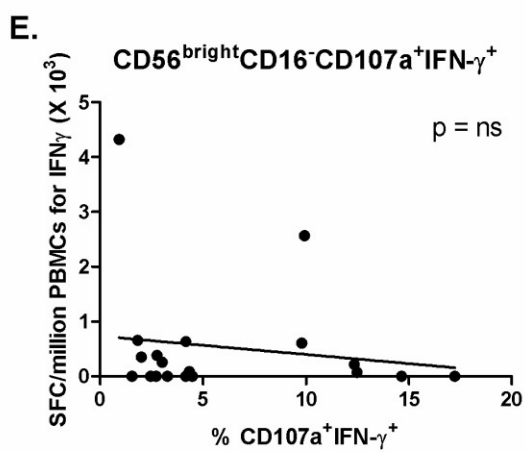
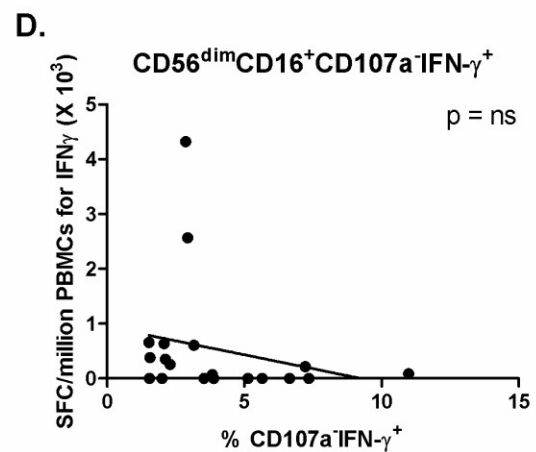
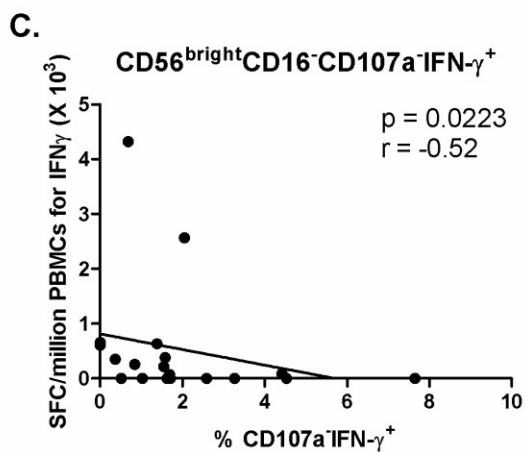
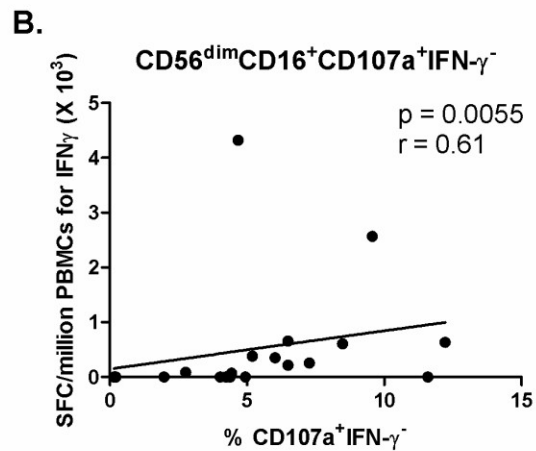
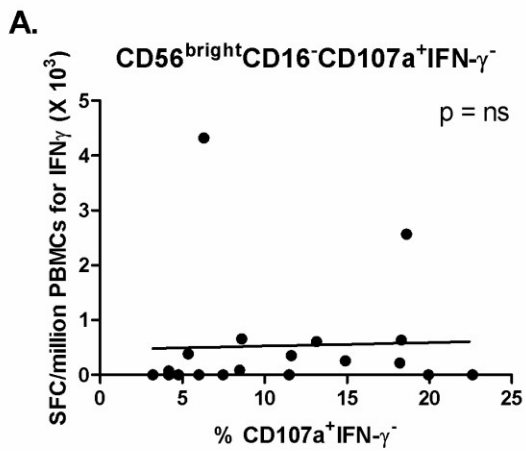
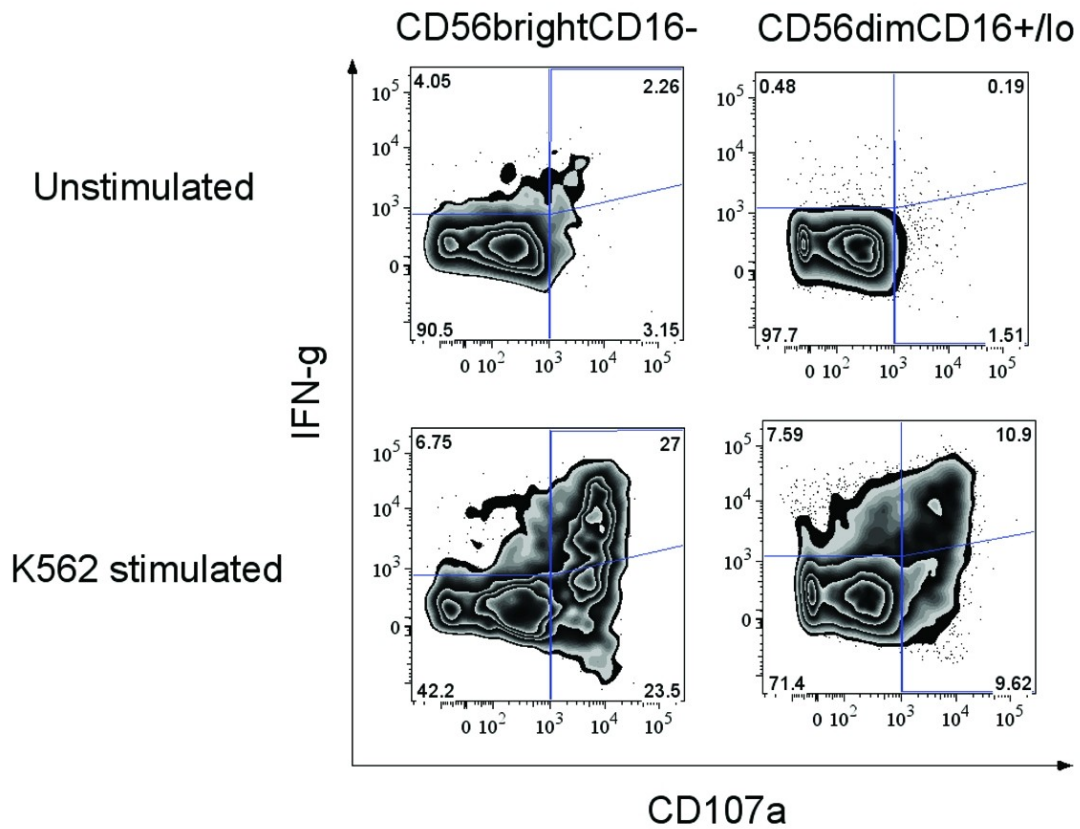


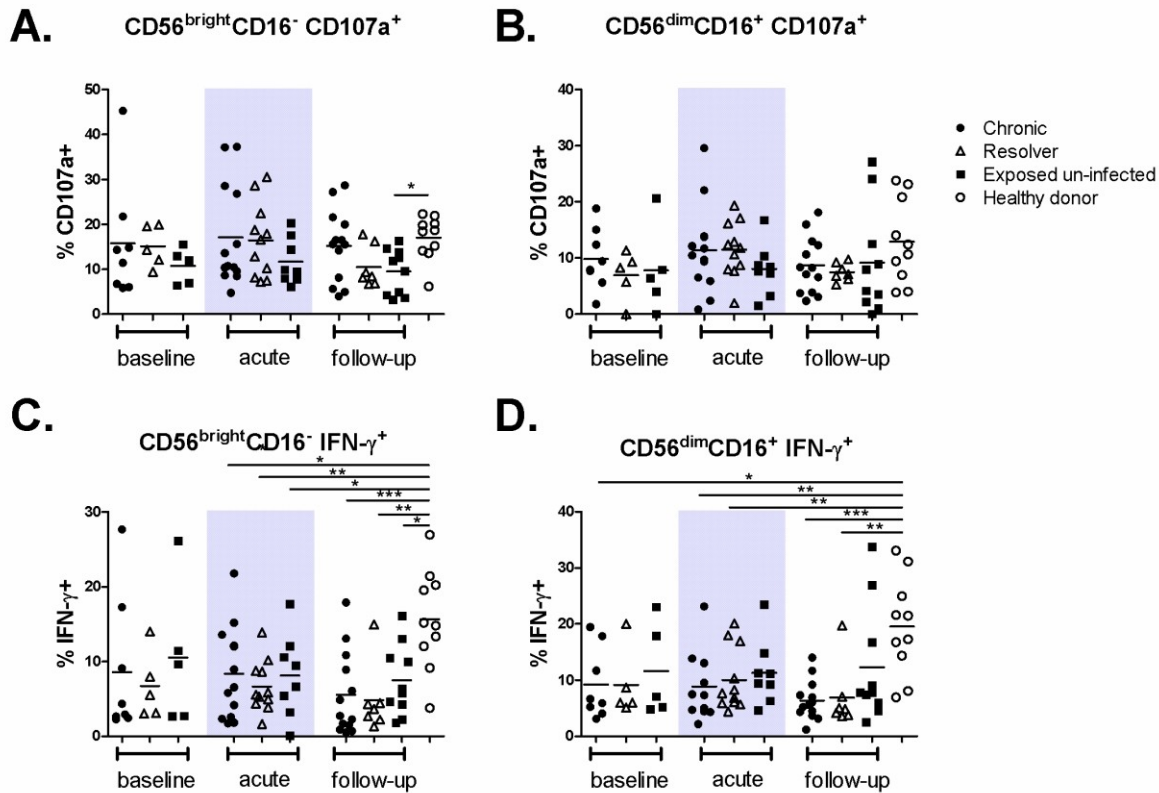
Figure 6^{m1}: NK cell degranulation correlates positively but IFN- γ correlates negatively with HCV-specific T cell adaptive immune response.

NK cell degranulation and IFN- γ production were determined in patients with HCV chronic evolution and HCV spontaneous resolution during the acute phase of HCV as shown in Figs. 2 and 3. The magnitude of the HCV-specific T cell response approximately 1 month later in these same patients was determined by IFN- γ secretion in response to overlapping HCV peptides spanning the entire HCV polyprotein using the ELISPOT assay. (A) Correlation between HCV-specific T cell response and frequency of CD107a⁺IFN- γ ⁻ cells gated on CD56^{bright}CD16⁺ NK cells, (B) frequency of CD107a⁺IFN- γ ⁻ cells gated on CD56^{dim}CD16⁻ NK cells, (C) frequency of CD107a⁻IFN- γ ⁺ cells gated on CD56^{bright}CD16⁺ NK cells, (D) frequency of CD107a⁻IFN- γ ⁺ cells gated on CD56^{dim}CD16⁻ NK cells, (E) frequency of CD107a⁺IFN- γ ⁺ cells gated on CD56^{bright}CD16⁺ NK cells, (F) frequency of CD107a⁺IFN- γ ⁺ cells gated on CD56^{dim}CD16⁻ NK cells. Correlation determined with Spearman test.



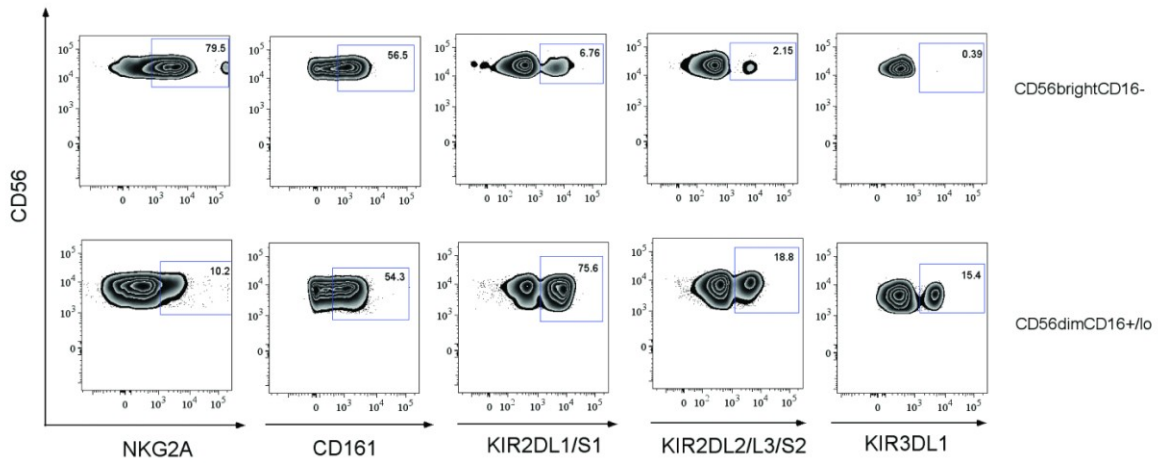
Supplementary Figure 1^{m1}: Representative flow cytometry staining for CD107a and IFN- γ .

Degranulation was measured by CD107a surface staining and cytokine production was measured by intracellular IFN- γ . PBMCs were co-incubated with (bottom row) or without (top row) K562 target cells. CD107a⁺ and IFN- γ ⁺ cells were gated on both NK cell subsets: CD56^{bright}CD16⁻ (left column) and CD56^{dim}CD16^{+/-lo} (right column).



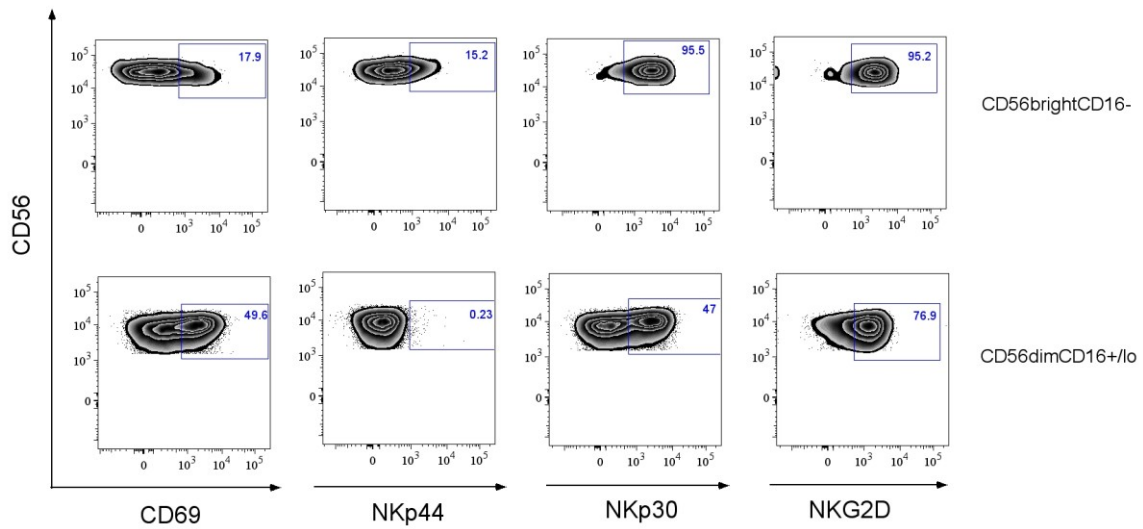
Supplementary Figure 2^{m1}: Total CD107a expression and total IFN- γ production.

Degranulation was measured by CD107a surface staining in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (▲), exposed un-infected (■) and healthy donors (○). PBMCs were co-incubated with or without K562 target cells. Background expression of CD107a was subtracted from expression with target cells. (A) Frequency of CD107a⁺ cells gated on CD56^{bright}CD16⁻ NK cells and (B) CD56^{dim}CD16⁺ NK cells. (C) Frequency of IFN- γ ⁺ cells gated on CD56^{bright}CD16⁻ NK cells and (D) CD56^{dim}CD16⁺ NK cells. The acute phase of HCV infection is represented by the shaded area. Mean is represented by a horizontal bar. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. 2-way ANOVA (repeated measures) or 1-way ANOVA (comparison with healthy donors).



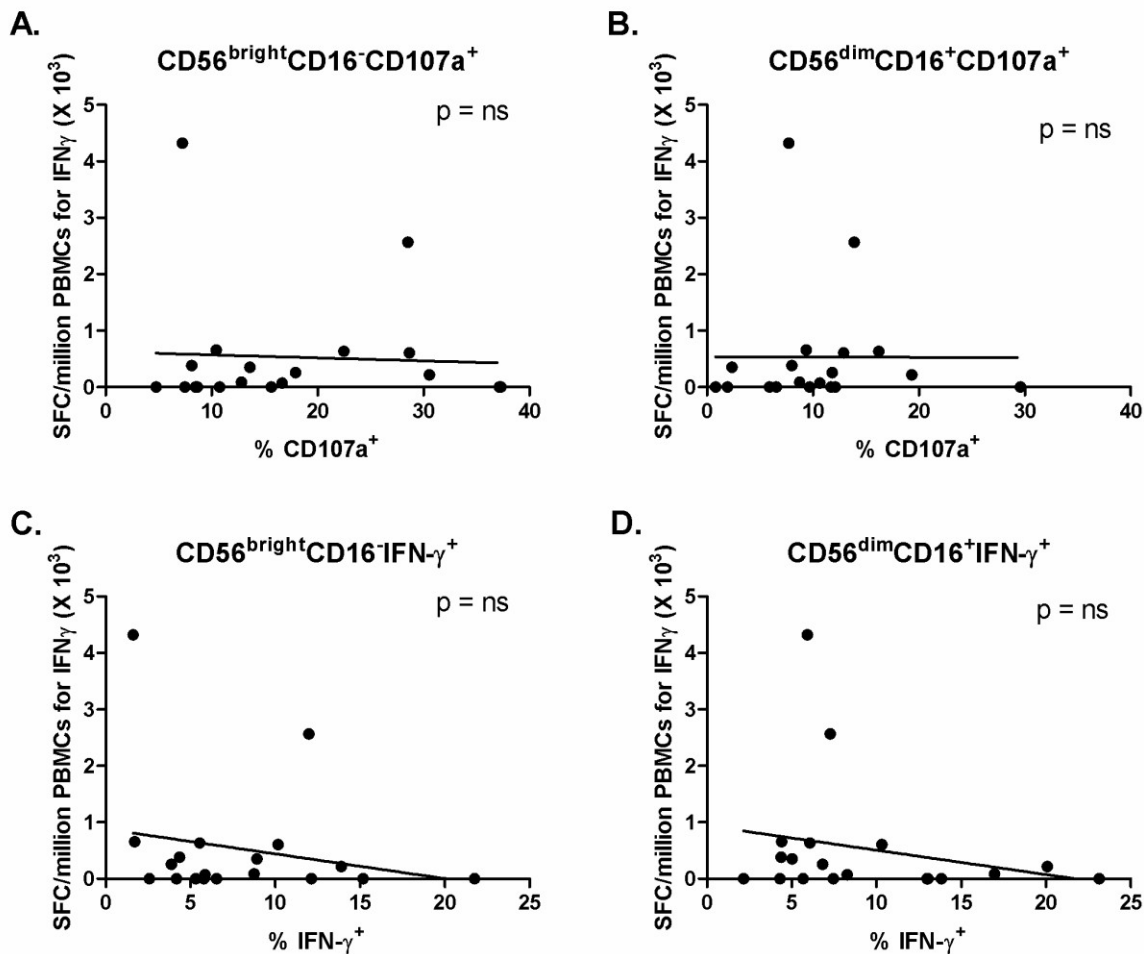
Supplementary Figure 3^{m1}: Representative flow cytometry staining for inhibitory receptors.

Five inhibitory receptors (NKG2A, CD161, KIR2DL1/S1, KIR2DL2/L3/S2 and KIR3DL1) were examined *ex-vivo* in both NK cell subsets: CD56^{bright}CD16⁻ (top row) and CD56^{dim}CD16^{+/lo} (bottom row).



Supplementary Figure 4^{m1}: Representative flow cytometry staining for activation markers and activating receptors.

One activation marker (CD69) and three activating receptors (NKp44, NKp30 and NKG2D) were examined *ex-vivo* in both NK cell subsets: CD56^{bright}CD16⁻ (top row) and CD56^{dim}CD16^{+/lo} (bottom row).



Supplementary Figure 5^{m1}: Total CD107a expression and total IFN- γ production do not correlate with HCV-specific T cell responses.

NK cell degranulation and IFN- γ production were determined in patients with HCV chronic evolution and HCV spontaneous resolution during the acute phase of HCV as shown in Supplementary Fig. 2. The magnitude of the HCV-specific T cell response approximately 1 month later in these same patients was determined by IFN- γ secretion in response to overlapping HCV peptides spanning the entire HCV polyprotein using the ELISPOT assay. (A) Correlation between HCV-specific T cell response and frequency of $CD107a^{+}$ cells gated on $CD56^{bright}CD16^{+}$ NK cells, (B) frequency of $CD107a^{+}$ cells gated

on CD56^{dim}CD16⁻ NK cells, (C) frequency of IFN- γ ⁺ cells gated on CD56^{bright}CD16⁺ NK cells, (D) frequency of IFN- γ ⁺ cells gated on CD56^{dim}CD16⁻ NK cells. Correlation determined with Spearman test.

References

- [1] Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36: S21–S29.
- [2] Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007;25:71–99.
- [3] Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 2004;58: 391–424.
- [4] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633–640.
- [5] Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2005;5:112–124.
- [6] Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, et al. Effector and regulatory events during natural killer–dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 2006;214:219–228.
- [7] Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002;195:343–351.
- [8] Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 2005;106:566–571.
- [9] Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002;195:335–341.
- [10] Crotta S, Stilla A, Wack A, D’Andrea A, Nuti S, D’Oro U, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002;195:35–41.
- [11] Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195: 43–49.
- [12] Yoon JC, Shiina M, Ahlenstiel G, Rehmann B. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* 2009;49:12–21.
- [13] Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872–874.
- [14] Romero V, Azocar J, Zuniga J, Clavijo OP, Terreros D, Gu X, et al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol* 2008;45:2429–2436.
- [15] Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrath E, Conroy MJ, Ryan EJ, Hegarty JE, et al. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 2008;57:1121–1128.
- [16] Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110:1225–1232.
- [17] Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AE, et al. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 2006;43:573–580.

- [18] Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 2006;55:869–877.
- [19] Meier UC, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C, et al. Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J Virol* 2005;79: 12365–12374.
- [20] Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1997;109:451–457.
- [21] Cox AL, Page K, Bruneau J, Shoukry NH, Lauer GM, Kim AY, et al. Rare birds in North America: acute hepatitis C cohorts. *Gastroenterology* 2009;136: 26–31.
- [22] Sherman M, Shafran S, Burak K, Doucette K, Wong W, Girgrah N, et al. Management of chronic hepatitis C: consensus guidelines. *Can J Gastroenterol* 2007;21:25C–34C.
- [23] Badr G, Bedard N, Abdel-Hakeem MS, Trautmann L, Willems B, Villeneuve JP, et al. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8⁺ memory T cells. *J Virol* 2008;82: 10017–10031.
- [24] Alter G, Malenfant JM, Delabre RM, Burgett NC, Yu XG, Lichterfeld M, et al. Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection. *J Immunol* 2004;173:5305–5311.
- [25] Vallejo R, de Leon-Casasola O, Benyamin R. Opioid therapy and immunosuppression: a review. *Am J Ther* 2004;11:354–365.
- [26] Novick DM, Ochshorn M, Ghali V, Croxson TS, Mercer WD, Chiorazzi N, et al. Natural killer cell activity and lymphocyte subsets in parenteral heroin abusers and long-term methadone maintenance patients. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;250:606–610.
- [27] Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, et al. Immunodominant CD4⁺ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 1997;71:6011–6019.
- [28] Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, et al. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2004;127:924–936.
- [29] Lauer GM, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, et al. Full-breadth analysis of CD8⁺ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection and early therapy. *J Virol* 2005;79:12979–12988.
- [30] Smyk-Pearson S, Tester IA, Lezotte D, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Rosen HR. Differential antigenic hierarchy associated with spontaneous recovery from hepatitis C virus infection: implications for vaccine design. *J Infect Dis* 2006;194:454–463.
- [31] Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J Immunol* 1990;145:3194–3201.
- [32] Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008;112:461–469.
- [33] Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D’Agostino A, Costa R, et al. CD56^{bright}CD16⁻ killer Ig-like receptor-NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56^{dim} NK cells upon activation. *J Immunol* 2007;178:4947–4955.
- [34] Deignan T, Curry MP, Doherty DG, Golden-Mason L, Volkov Y, Norris S, et al. Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2002;37:101–108.

- [35] Boisvert J, Kunkel EJ, Campbell JJ, Keeffe EB, Butcher EC, Greenberg HB. Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. *J Hepatol* 2003;38:67–75.
- [36] Kawarabayashi N, Seki S, Hatsuse K, Ohkawa T, Koike Y, Aihara T, et al. Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;32:962–969.
- [37] Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, Michelone G, Zaramella M, Mavilio D, et al. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 2009;137: 1151–1160.
- [38] Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, Edlich B, Feld JJ, Rotman Y, et al. Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon- α -dependent manner. *Gastroenterology* 2010;138: 325–335.
- [39] Friedman H, Newton C, Klein TW. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:209–219.
- [40] Ugen KE, Nyland SB. Injecting drugs of abuse and immunity: implications for HIV vaccine testing and efficacy. *Springer Semin Immunopathol* 2006;28: 281–287.
- [41] Wang J, Barke RA, Ma J, Charboneau R, Roy S. Opiate abuse, innate immunity, and bacterial infectious diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008;56:299–309.
- [42] De Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, Costa P, et al. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol* 2007;37:445–455.
- [43] Bonorino P, Ramzan M, Camous X, Dufeu-Duchesne T, Thelu MA, Sturm N, et al. Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatol* 2009;51:458–467.
- [44] Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, et al. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004;173:6072–6081.
- [45] Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004;294: 15–22.
- [46] Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, Whitley K, Bahjat KS, Beutler B, et al. NK-cell mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell mediated and humoral responses. *Blood* 2009;113:6593–6602.
- [47] Andoniou CE, van Dommelen SL, Voigt V, Andrews DM, Brizard G, Asselin- Paturel C, et al. Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol* 2005;6:1011–1019.
- [48] Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, John B, Sampson B, Wuensch S. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev* 2006;213: 101–118.
- [49] Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009;27:147–163.

SECTION 4 : MANUSCRIT 2

Sustained Hyperresponsiveness of Dendritic Cells is Associated with Spontaneous Resolution of Acute Hepatitis C

Manuscript in revision in Journal of Virology

Sandy Pelletier^{1,2}, Elias Said^{1,2,*}, Petronela Ancuta^{1,2}, Julie Bruneau^{1,3}, Naglaa H. Shoukry^{1,4,#}

¹Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital St-Luc, ²Département de microbiologie et immunologie, ³Département de médecine familiale and ⁴Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

* Present address: Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine and Health Sciences, Sultan Qaboos University (SQU), Alkhoudh, Oman

Address Correspondence and Reprint Requests to:

Dr. Naglaa H. Shoukry, Centre de Recherche du CHUM, Hôpital St-Luc, 264 boul. René-Lévesque Est, Local PEA-316, Montréal (Québec) H2X 1P1, CANADA

S. Pelletier est responsable en totalité de la réalisation des travaux de recherche. P. Ancuta a fourni des réactifs. P. Ancuta et E. Said ont apporté une contribution intellectuelle. J. Bruneau a contribué à l'obtention des échantillons cliniques utilisés pour les travaux de recherche. S. Pelletier est responsable de la réalisation des figures du manuscrit, ainsi que des statistiques. S. Pelletier et N. Shoukry sont responsables de la planification des travaux et de l'écriture de ce manuscrit. N. Shoukry a supervisé l'ensemble de l'étude.

Abbreviations

ALT, alanine aminotransferase; ANOVA, analysis of variance; CD, cluster of differentiation; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FBS, fetal bovine serum; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; HLA, human leucocyte antigen; ICS, intracellular cytokine staining; IDU, intravenous drug user; IFN, interferon; IL, interleukin; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; ISG, interferon-stimulated gene; IRF-7, interferon regulatory factor 7; Lin, lineage; LPS, lipopolysaccharide; mDC, myeloid dendritic cell; MDDC, monocyte derived dendritic cell; MFI, mean fluorescence intensity; MHC, major histocompatibility complex; PAMP, pathogen associated molecular pattern; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; pDC, plasmacytoid dendritic cell; PDL, programmed death-1 receptor ligand; RIG-I, retinoic acid inducible gene I; ssRNA, single stranded RNA; Th, T helper; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor

Abstract

Several studies have reported that dendritic cells (DCs) are dysfunctional during chronic hepatitis C virus (HCV) infection. However, the function of DCs during the acute phase of the infection and their role in determining infectious outcome remain elusive. Here, we examined the phenotype and function of myeloid DCs (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs) in a cohort of intravenous drug users during acute HCV infection with either chronic evolution (n=15) or spontaneous resolution (n=10). We examined the frequency, maturation status and cytokine production of DCs in response to the TLR4 and TLR7/8 ligands (LPS and ssRNA). Several observations could discriminate spontaneous HCV resolvers during acute infection. First, a decrease in the frequency of mature CD86+, PDL1+ and PDL2+ pDCs. This immature phenotype was associated with increased sensitivity of pDCs from resolvers versus chronics to ssRNA stimulation *in vitro*. Second, LPS stimulated mDCs from resolvers produced higher levels of cytokines as compared to chronics. Third, mDCs from all patients, irrespective of the outcome, produced higher levels of cytokines during the early acute phase in response to ssRNA compared to controls. However, this hyperresponsiveness was sustained only in spontaneous resolvers. Altogether, our results suggest that pDC immature phenotype and sustained pDC and mDC hyperresponsiveness are associated with spontaneous resolution of HCV infection.

Introduction

Only a small proportion of individuals exposed to hepatitis C virus (HCV) eliminate the virus spontaneously while the majority develop persistent infection and chronic liver disease (19). Spontaneous resolution of acute HCV is associated with the development of a robust and sustained HCV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell response (34). However, the mechanisms underlying the failure to sustain such an immune response in individuals who develop chronic infection remain largely unknown. Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells that are crucial in initiating adaptive immune responses and could represent one of the bottle necks in induction of an efficient anti-HCV T cell response. Two major subsets of peripheral DCs exist in humans: CD11c⁺ myeloid DCs (mDCs) and CD123⁺ plasmacytoid DCs (pDCs). Both DC subsets are able to sense pathogens through pattern recognition receptors such as toll-like receptors (TLRs). mDCs express several TLRs including TLR3, TLR7 and TLR8 which allow them to recognize double-stranded (ds) RNA viruses and single-stranded (ss) RNA viruses, respectively. pDCs also express several TLRs including TLR7 that recognizes ssRNA viruses. Under constitutive conditions, DCs are in an immature state, where they express relatively lower levels of MHC class I and II molecules as well as co-stimulatory receptors but have high phagocytic capacity. Upon antigen uptake and recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by TLRs, DCs upregulate MHC and co-stimulatory molecules and acquire an activated mature phenotype which allows them to prime naive T cells through multiple signals (22). The first signal comes from processing of antigenic material and subsequent presentation of peptides by MHC class I and II that are then recognized by the specific T cell receptor. The second signal comes from co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86 that stabilize DC interaction with T cells. The third signal comes from cytokines that can bias T cells towards a particular lineage. For example, IL-12 directs T cells towards the Th1 lineage while IL-4 favors a Th2 lineage and IL-23 favors Th17 lineage (23).

Because of the importance of DCs in initiating T cell responses, many researchers have hypothesized that dysfunctional DCs play a role in HCV persistence. Due to the low frequency of DCs in PBMCs, most of the initial studies were conducted on monocyte derived DCs (MDDCs) from chronic HCV patients. Although studies yielded conflicting results, most of them reported that MDDCs from HCV-infected individuals exhibited a normal phenotype (2, 13, 28) but impaired allostimulatory

capacity (5, 24). However, monocytes and DCs may not be affected in the same way by HCV, so studies on MDDCs might not accurately reflect the functional profile of DCs *in vivo*. With the development of multiparameter flow cytometry analysis, more recent studies were performed on peripheral blood mDCs and pDCs *ex-vivo*. There is a general consensus that mDC and pDC frequencies are reduced during chronic HCV infection (1, 17, 32). However, conflicting results were reported regarding the functional status of mDCs and pDCs including their capacity to induce allogenic T cell responses and cytokine production (3, 11, 25, 26, 28, 29, 32, 33). The reasons for these discrepancies between the different studies are not clear but may depend on several factors such as the stimulus used to activate DCs (cytokines or TLR agonists), HCV genotype, duration of the infection, patient age/gender or co-infection with other chronic viruses. Notably, DC functional alterations during acute HCV where functional defects may have a crucial effect on priming of adaptive T cell responses, were not extensively studied. In particular, it is not clear from studies so far whether defects in DC function, if any, occur during acute infection and whether the dysfunction observed by several groups during chronic HCV is the cause or the consequence of viral persistence.

In this study, we used multiparametric flow cytometry to monitor longitudinally the phenotypic and functional changes in mDCs and pDCs from a unique cohort of intravenous drug users during acute HCV infections that progressed to spontaneous resolution or viral persistence. We report that spontaneous resolution of HCV was associated with an immature phenotype of pDCs and sustained hyperresponsiveness of pDCs and mDCs to TLR 7/8 stimulation.

Patients and Methods

Study subjects and clinical follow-up.

A total of twenty five HCV acutely-infected individuals and fifteen healthy donors were included in this study. Acute HCV-infected subjects were recruited among high-risk IDUs participating in the Montreal Acute HepC cohort study (HEPCO), the methadone maintenance program and the Hepatology clinics at St-Luc hospital of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). This study was approved by the institutional ethics committee (Protocols # SL05.014 and SL05.025) and conducted according to the Declaration of Helsinki. All participants signed informed consent upon enrolment. Acute HCV infection (n=25) was defined as detection of positive HCV RNA and/or HCV antibodies following a previous negative test in the past 6 months, or positive HCV RNA with concomitant negative HCV antibodies tests. The mean follow-up interval between the last aviremic and the first viremic time point was 3 months (range: 1-25 weeks), and the estimated time of infection was defined as the median between the last aviremic and the first viremic time points. Duration of infection was defined as the time (in months) post estimated time of infection. Spontaneous viral resolution (n=10) or persistent infection (n=15) was defined as the absence or presence of HCV RNA at 6 months post enrolment. In this study, three time points were analyzed for each patient representing three phases of HCV infection: early acute, late acute and follow-up. Early acute HCV was defined as 2 months +/- 1 month, late acute was defined as 8 months +/- 2 months and the follow-up time point was defined as 17 months (+/- 6 months) post estimated time of infection. All patients tested negative for human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV), and were either medically ineligible or declined IFN therapy.

HCV RNA testing and quantification.

Qualitative HCV RNA tests were performed using an automated COBAS AmpliPrep/COBAS Amplicor HCV test, version 2.0 (sensitivity, 50 IU/ml) (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). HCV genotyping was done using standard sequencing for the NS5B region, and was performed by the Laboratoire de Santé Publique du Québec (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) as part of the clinical follow-up of patients. Additional HCV RNA quantification was performed using an in-house

quantitative real-time reverse transcription-PCR assay as previously described (4). For statistical analysis, plasma samples with undetectable HCV RNA were given a value of 100 IU/ml which is the limit of detection.

Flow cytometry antibodies and reagents.

Directly conjugated antibodies against the following molecules were used: CD3 Alexa-700 (clone UCHT1), CD14 Alexa-700 (clone M5E2), CD19 Alexa-700 (clone HIB19), CD56 Alexa-700 (clone B159), CD86 PE-Cy5 (clone IT2.2), CD123 PE (clone 7G3), HLA-DR APC-H7 (clone L243), IL-6 FITC (clone MQ2-6A3), IL-12p70 APC (clone C11.5), PDL1 PE-Cy7 (clone MIH1), PDL2 APC (MIH18), TNF- α PerCP-Cy5.5 (clone MAb11) (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA); CD11c Pacific Blue (clone Bu15), CD83 PerCP-Cy5.5 (clone HB15e) (both from BioLegend, San Diego, CA, USA). Live cells were identified using an Aqua Live/Dead fixable dead cell Stain Kit (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. "Fluorescence minus one" control stains were used to determine background levels of staining. Multiparameter flow cytometry was performed using a standard BD LSR II instrument equipped with blue (488 nm), red (640 nm), violet (405 nm) and yellow-green lasers (561nm) (BD Biosciences) to systematically perform nine-color staining using FACSDiva software (version 5) (BD Biosciences). Compensation was performed with single fluorochromes and BD CompBeads (BD Biosciences). Data files were analyzed using FlowJo software, version 9.4.10 for Mac (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Polyfunctional data were exported using Boolean gates in FlowJo and further analyzed using PESTLE software (version 1.6.2) and SPICE software (version 5.22) obtained from M. Roederer, National Institutes of Health, Bethesda, MD (37).

Antigen uptake assay.

All flow cytometry assays were performed on cryopreserved samples. PBMCs were thawed and rested for 16h at 5×10^6 cells/ml in RPMI (Life Technologies), 2% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM glutamine and non-essential amino acids (all from Life Technologies). The FBS lot used was tested and shown not to induce non specific DC maturation. After resting, $2-4 \times 10^6$ PBMCs were left un-stimulated for 24h. To evaluate

endocytosis, un-stimulated cells were then incubated with FITC-dextran as previously described (46). Briefly, PBMCs were washed, resuspended at 20×10^6 cells/ml in PBS, 1% FBS and distributed in two 96-well U-bottom plates before adding 1 mg/ml FITC-dextran (molecular weight = 40 000; Life Technologies). The FITC-dextran solution was vortexed for 30s and sonicated for an additional 30s immediately before use. One plate was incubated at 37°C (specific FITC-dextran uptake) and the second was incubated at 4°C (baseline uptake) for 30 min. Cells were washed twice in fluorescence activated cell sorting (FACS) buffer (1× phosphate-buffered saline [PBS], 1% FBS, 0.02% NaN₃) and surface stained as described below.

Multiparametric phenotypic characterization of DCs.

$1-2 \times 10^6$ PBMCs were stimulated with 1 µg/ml LPS (*E. Coli* 026:B6; Sigma) or with 5 µg/ml ssRNA40/LyoVec (Invivogen, San Diego, CA, USA) for 24h. For phenotypic characterization, unstimulated (cells used for antigen up-take assay described above) and stimulated PBMCs were then stained with surface antibodies for 30 mins at 4°C, washed twice in FACS buffer, then fixed in FACS Fix buffer (1× PBS, 1% formaldehyde). Percent specific expression of FITC-dextran is calculated as the background-adjusted uptake at 37°C or 4°C. Un-stimulated PBMCs incubated with FITC-dextran at 4°C served as negative control to calculate percent specific up-regulation of phenotypic markers after TLR ligand stimulation.

Intracellular cytokine staining (ICS).

PBMCs were thawed and rested as described above. $1-2 \times 10^6$ PBMCs were then either un-stimulated or stimulated with 1 µg/ml LPS or 5 µg/ml ssRNA40/LyoVec at 37°C. Following 1 h of stimulation, 10 µg/ml of brefeldin A (Sigma-Aldrich) was added, and cells were incubated for a total of 6 h. Cells were washed with FACS buffer, stained for viability and cell surface antigens, then permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm solution (BD Bioscience). Cells were then stained with anti-IL-6, -IL-12 and -TNF-α antibodies for 30 min, washed twice in BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and fixed in FACS fix buffer.

Statistical analysis.

Comparisons between patient groups with HCV chronic evolution and spontaneous resolution, during early acute, late acute and follow-up phases of infection, were evaluated by 2-way ANOVA (repeated measures). Data were analyzed with SigmaPlot 11.0 for Windows (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA). Comparisons between HCV chronic evolution, spontaneous resolution and healthy donors were evaluated by 1-way ANOVA. Correlations were evaluated by Pearson's test if data passed normality test or by Spearman's test if data did not pass normality. Data were analyzed with GraphPad Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Reduced frequency of pDCs during acute HCV infection with chronic evolution.

We examined longitudinally the phenotype and function of DCs during acute HCV infection with either persistent viremia (n=15) or spontaneous viral clearance (n=10). Thereafter, referred to as chronics and resolvers, respectively. Fifteen healthy donors were also included. The longitudinal follow-up of HCV-infected patients included 3 time points post estimated date of infection: early acute (2 ± 1 month); late acute (8 ± 2 months); long term follow-up (17 months ± 6 months). Patients' demographics and characteristics are listed in Table 1. First, we monitored longitudinally the frequency of mDCs ($\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^+ \text{CD11c}^+$) and pDCs ($\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^+ \text{CD11c}^- \text{CD123}^+$). DC gating strategy by flow cytometry is shown in Figure 1A. The frequency of mDCs did not change significantly between patient groups or between infection time points (Figure 1B). However, the frequency of pDCs was generally lower in HCV-infected individuals irrespective of the group or phase of infection (Figure 1C). This reduced frequency of pDCs became statistically significant only in individuals with persistent viremia as compared to healthy donors during the long-term follow-up ($p = 0.027$). Furthermore, we evaluated if the level of viremia correlated with pDC frequency. Two analyses were performed; i) on samples from all patients whether viral RNA was detectable or not; and ii) on samples from patients with detectable plasma viral load (>100 IU/ml). A negative correlation was observed between viral load and pDC frequency in all samples ($r = -0.25$; $p = 0.051$). This correlation was more statistically significant when only patients with detectable HCV RNA were considered in the analysis ($r = -0.44$; $p = 0.009$). Our findings suggest that pDCs become reduced in frequency with HCV persistence and that this reduction might be associated with high levels of viral replication.

An immature phenotype of mDCs during acute HCV irrespective of infectious outcome.

Under steady state conditions DCs exhibit immature phenotypes with low expression of MHC and co-stimulatory molecules. Once immature DCs sense foreign pathogens, they up-regulate these molecules and acquire a mature phenotype. To examine the maturation status of mDCs, we performed phenotypic characterization of this peripheral blood DC subset by monitoring expression of the co-stimulatory molecule CD86, the maturation marker CD83 and the inhibitory receptors PDL1 and PDL2

directly *ex vivo* or following stimulation *in vitro*. Representative flow cytometry plots are shown in Figure 2A. We observed a tendency towards a reduced frequency of CD86⁺ and PDL1⁺ mDCs *ex-vivo* in all HCV-infected individuals, irrespective of the infectious outcome (Figures 2B and 2C) compared to healthy donors but this tendency was only significant in patients with chronic evolution at the long-term follow-up time point (CD86⁺: p = 0.023; PDL1⁺: p = 0.02). Similarly, a tendency toward reduced levels of PDL2⁺ mDCs *ex-vivo* was observed in all patients but this difference became statistically significant only during long-term follow up in patients who cleared their infection (Figure 2D) (p = 0.04), suggesting that not all markers follow the same trend. No differences in mDC phenotype were observed between chronics and resolvers or between time points of infection. We also monitored the expression of the maturation marker CD83 but no differences were observed between patient groups (data not shown).

In order to assess the function of DCs, we examined the activation and maturation of mDCs, measured by the upregulation of the same molecules, following stimulation by LPS or ssRNA, ligands for TLR4 and TLR7/8, respectively. No differences were observed in the frequency or mean fluorescence intensity (MFI) of most maturation markers in response to ssRNA or LPS (data not shown). The only difference was observed following ssRNA stimulation, where mDCs from resolvers up-regulated PDL1 expression to a higher level during the early acute and follow-up phases compared to healthy donors (Figure 2E). Furthermore, a negative correlation was observed between *ex-vivo* expression of PDL1 and up-regulation of PDL1 following ssRNA stimulation (Figure 2F) (r = -0.706; p < 0.0001), suggesting that immature mDCs are more responsive to ssRNA than mature mDCs. In summary, mDCs from HCV infected individuals, irrespective of the disease outcome, had a more immature phenotype compared to healthy donors, especially with prolonged infection.

pDC immature phenotype correlates with spontaneous resolution.

The phenotype of pDCs was also examined in samples which had >90 events in the CD123⁺ gate. We observed that the frequency of CD86⁺, PDL1⁺ or PDL2⁺ pDCs *ex-vivo* was generally lower in HCV-infected individuals than in healthy donors albeit slight differences between the time points studied (Figures 3A-C). Despite this general immature phenotype, differences were observed between HCV resolvers and chronics that became more significant at later time points post infection. Resolvers compared to chronics demonstrated a general tendency for a lower frequency of CD86⁺, PDL1⁺ or

PDL2⁺ pDCs. This difference became statistically significant during the late acute phase for CD86 and PDL1 (Figures 3A and 3B) (CD86⁺ during late acute: $p = 0.05$; CD86⁺ during follow-up: $p = 0.014$; PDL1⁺ during late acute: $p = 0.021$). In contrast, the frequency of PDL2⁺ pDCs was lower in resolvers compared to chronics. Statistical analysis using the 2-way repeated measures ANOVA test demonstrated that the two groups were statistically different overall but this difference was never significant at any of the time points studied probably due to the limited numbers in each group (Figure 3C) ($p = 0.027$). We also monitored the expression of the maturation marker CD83 but no differences were observed between patient groups (data not shown).

Finally, we evaluated the activation and maturation status of pDCs after TLR-7 ligand (ssRNA) stimulation. Interestingly, pDCs from resolvers that had the most immature phenotype and expressed the lowest levels of the maturation marker CD86 (Figure 3A), underwent the highest upregulation of this marker following stimulation compared to both healthy donors and chronics (Figure 3D) (Δ CD86⁺ during late acute: $p = 0.043$; Δ CD86⁺ during follow-up: $p = 0.023$). Furthermore, chronics had higher up-regulation of CD86 during the early acute phase in comparison to the late acute phase ($p = 0.028$). Moreover, a negative correlation was observed between *ex-vivo* expression of CD86 and up-regulation of CD86 after ssRNA stimulation (Figure 3E) ($r = -0.799$; $p < 0.0001$). Finally, we observed a negative correlation between the frequency of CD86⁺ pDCs after ssRNA stimulation and viral load in all samples ($r = -0.37$; $p = 0.016$). No differences were noted for the frequency or MFI of other phenotypic markers monitored after ssRNA stimulation. In summary, pDCs from HCV-infected individuals, irrespective of disease outcome, had a more immature phenotype than healthy donors, but this phenotype was more prominent in resolvers. This immature phenotype of pDCs in resolvers was associated with a superior ability to respond to ssRNA stimulation by up-regulating costimulatory molecule expression.

Increased cytokine production in response to TLR4 and TLR7/8 stimulation in acute resolving HCV.

DCs secrete several pro-inflammatory cytokines that influence the development of adaptive immune responses. We studied the capacity of mDCs to secrete IL-6, IL-12 and TNF- α in response to LPS and ssRNA stimulation (Figure 4A). pDCs were not studied since previous reports have shown that their function is altered by cryopreservation (21). No differences were monitored between groups and time points regarding the ability of mDCs to produce IL-6 and IL-12 in response to LPS (Figures 4B and

4C). Similarly, no differences were observed between resolvers and chronics during the early acute phase regarding the ability of mDCs to produce TNF- α in response to LPS stimulation. However, with disease progression towards resolution or persistence, we observed increased frequencies of TNF- α producing mDCs in resolvers as compared to chronics during the late acute and follow-up phases (Figure 4D). To evaluate the combined contribution of the different cytokines that may reflect a higher activation status, we analyzed cytokine production using the Spice software (37) that allowed us to determine the frequency of cells producing one, two or three cytokines. We evaluated the frequency of mDCs producing all three cytokines (IL-6⁺IL-12⁺TNF- α ⁺) in response to LPS stimulation, but no differences were observed (Figure 4E). Given the increased frequency of TNF- α producing mDCs, we examined whether response to LPS stimulation and production of the different cytokines was influenced by plasma viral load. However, no correlation was observed between cytokine secretion and viral load except a negative correlation between the secretion of IL-12 in response to LPS and plasma viral load (Figure 4F).

Next, we evaluated the ability of mDCs to produce these cytokines in response to ssRNA stimulation. In general, we observed no major difference in IL-6 production by mDCs between different donors and different phases of infection except a slight increase in resolvers during the early acute phase compared to healthy donors (Figure 5A) ($p = 0.026$). In contrast, we observed a significantly high level of IL-12 production by mDCs from both resolvers and chronics as compared to healthy donors during all time points except for the late acute (Figure 5B) (resolvers during early acute: $p < 0.001$; chronics during early acute: $p = 0.013$; resolvers during late acute: $p = 0.005$; resolvers during follow-up: $p < 0.001$; chronics during follow-up: $p < 0.001$). Similarly, we observed higher TNF- α response in both resolvers and chronics during the early acute phase as compared to healthy donors. This increased response was only sustained in resolvers and gradually diminished in chronics at the later stages of infection (Figure 5C) (resolvers during early acute: $p = 0.004$; chronics during early acute: $p = 0.02$; resolvers during late acute: $p < 0.001$; resolvers during follow-up: $p = 0.002$). Using Spice analysis, the same pattern was observed where the frequency of mDCs producing all three cytokines (IL-6⁺IL-12⁺TNF- α ⁺) (Figure 5D) was higher in resolvers and chronics as compared to healthy donors during the early acute phase. However, only resolvers continued to produce higher levels of cytokines compared to healthy donors during the late acute and follow-up phases (resolvers during early acute: $p < 0.001$; chronics during early

acute $p = 0.023$; resolvers during late acute: $p = 0.046$; resolvers during follow-up: $p = 0.043$). Furthermore, the overall frequency of IL-6⁺IL-12⁺TNF- α ⁺ mDCs was significantly higher in both resolvers and chronics during the early acute phase as compared to healthy donors but this difference was sustained only in resolvers (Figure 5D). Our findings suggest that during the early acute phase both resolvers and chronics are hyperresponsive to ssRNA stimulation compared to healthy donors, but this hyperresponsiveness is lost with viral persistence.

HCV viral load correlates with increased mDC antigen uptake.

In order to further assess the function of mDCs, we measured antigen uptake by using the FITC-dextran uptake assay (46). Representative flow cytometry plots are shown in Figure 6A. We observed no differences between the different groups of patients or different time points of infection regarding the frequency (data not shown) or the MFI (Figure 6B) of cells that have taken-up dextran beads. Nevertheless, a positive correlation was established between antigen uptake, measured by the MFI of dextran⁺ cells and viral load in patients with detectable HCV RNA (Figure 6C) ($r = 0.44$; $p = 0.009$). These results demonstrate that high levels of viral replication do not interfere with mDC antigen uptake but may even enhance it.

Discussion

We have analyzed for the first time the longitudinal evolution of mDC and pDC phenotype, as well as mDC function during acute HCV infection with either spontaneous resolution or chronic viral persistence. We observed that HCV-infected individuals, irrespective of the infection outcome, had a reduced frequency of mature ($CD86^+$, $PDL1^+$ and $PDL2^+$) mDCs and pDCs as compared to healthy donors. Acute resolving HCV was distinguished from chronic evolution by several features. First, pDCs from resolver patients expressed lower levels of DC maturation markers as compared to chronic evolution especially during later phases of infection. This relatively more immature state was associated with higher activation and upregulation of maturation markers upon stimulation with ssRNA. Second, mDCs from resolvers produced higher levels of TNF- α upon stimulation with the TLR-4 ligand LPS. Third, although both groups were hyperresponsive to stimulation with the TLR-7/8 ligand ssRNA during the early acute phase, this hyperresponsiveness, measured by the frequency of mDCs producing three different cytokines ($IL-6^+IL-12^+TNF\alpha^+$), was sustained only in resolvers. Altogether, these results suggest that DCs are activated during acute HCV and that sustaining such activity is essential to successful viral clearance.

We did not observe any change in frequency of peripheral blood mDCs during acute HCV regardless of the infection outcome. However, we observed a general trend of decreased frequencies of pDCs during acute HCV infection that became statistically significant only in chronics at the late follow-up phase. This is consistent with previous reports demonstrating normal mDC and pDC frequency during acute HCV (31) and reduced pDC frequency during chronic HCV as compared to healthy donors (1, 29, 35, 48). Several possibilities could explain this reduction in pDC frequency in the periphery. One possible mechanism is increased migration to the liver which is the site of HCV replication. Indeed, pDCs have been shown to localize to the liver during HCV infection (16, 44, 48), where they are thought to be the major producers of high amounts of type I and type III IFN as they are able to sense HCV-infected hepatocytes (43). A second mechanism is proposed by a recent study by Swiecki et al. (42) demonstrating that type I IFN produced in response to viral infection can mediate death of pDCs and thus modulate their frequency. This observation is particularly interesting in the setting of HCV infection for two reasons. First, we have demonstrated a negative correlation between pDC frequency and viral

load during acute HCV infection. Second, both acute and chronic HCV infections are characterized by high expression of type I IFN and interferon-stimulated genes (ISGs) in the liver of HCV-infected patients (39, 40) and chimpanzees (6, 7, 41, 45). It is therefore tempting to speculate that high and persistent plasma levels of type I IFN might be responsible for decreased pDC frequency during acute and chronic HCV infection but this will require further investigation.

We have observed an immature phenotype of pDCs in all HCV-infected patients, irrespective of the outcome, compared to healthy donors. This difference was more pronounced in resolvers during the late acute and follow-up phases. Despite the prevalence of such immature phenotype, pDCs from resolvers were hyperresponsive to ssRNA stimulation as compared to chronics and healthy donors and upregulated the maturation marker CD86. This may suggest a regulation mechanism used by pDCs to avoid excessive stimulation following viral clearance and to respond better to invading pathogens. Interestingly, this hyperresponsiveness correlated negatively with viral load suggesting that pDCs from acute HCV infection with chronic evolution are overstimulated due to high viral load and higher levels of type I IFN production and are less likely to respond to further stimulation. Similarly, mDC were hyperresponsive to ssRNA stimulation as demonstrated by higher cytokine production during acute HCV irrespective of outcome. However, this hyperresponsiveness was only sustained in resolvers. It is possible that such sustained hyperresponsiveness is essential for the maintenance of an efficient adaptive T cell response and long term memory that can protect against viral recurrence in resolvers. Increased mDC responsiveness to ssRNA during early acute HCV then its decline in chronics during late acute and long term follow-up phases suggest that mDCs are activated early during acute infection irrespective of infection outcome and that reduced mDC function is not the cause but rather an effect of persistent HCV infection perhaps through excessive stimulation. It is also possible that, loss of this hyperresponsiveness upon virus persistence and reduced cytokine production may be a beneficial shut-off mechanism to reduce inflammation and prevent virus induced immunopathology by favoring the induction of regulatory T cells that are known to play a role in the chronic evolution of HCV infection (9, 30).

Several potential observations could explain loss of mDC hyperresponsiveness in chronics during acute HCV. First TLR desensitization could explain decreased response to TLR ligands in chronic patients. It has been shown that HCV activates TLR2 (12, 15) and induces tolerance to further TLR2 or TLR4 stimulation (10). Furthermore, during HIV infection (8) microbial translocation leads to high LPS

plasma levels and TLR4 tolerance in monocytes. Interestingly, high LPS plasma levels was also observed during chronic HCV (38) and it is thought to occur because of decreased capacity of the damaged liver to filter LPS coming from the gut. In our study, we have measured LPS in the plasma of acute HCV patients, but levels were either low or undetectable, and did not correlate with TNF α production by mDCs in response to LPS stimulation (data not shown). Since acute HCV patients have minimal liver damage, low LPS in plasma was expected. Nonetheless, these results suggest that TLR4 tolerance through increased excessive stimulation is not the cause of reduced mDC function in chronics, at least during the acute and early chronic phase.

During chronic HCV infection the HCV-specific T cell response is defective but there is no overall immune defect. Memory T cells specific for other viruses such as cytomegalovirus or influenza have repeatedly been shown to be functional in chronic HCV patients (18, 47). In our study, we demonstrated that mDC cytokine production by chronic patients, although lower than resolvers, was not significantly different from healthy donors. Our results suggest no global defect in mDCs from chronics and they are in line with studies showing no global defect in T cell responses. This data suggest that defective DC function is not the cause of the inefficient HCV-specific T cell response in chronics. However, we cannot completely exclude a potential defect restricted to liver resident DCs. If this is the case, decreased antigen up-take, migration from the liver to the lymph nodes or antigen presentation to T cells could explain the defective HCV specific T cell responses. Another explanation for the selective impairment of HCV-specific T cells could be specific dysfunction of DCs presenting HCV antigens or those that have been in contact with the virus. The ability of HCV to productively infect DCs is controversial (14) but it is possible that phagocytosis of apoptotic HCV-infected hepatocytes and expression of HCV-proteins is enough to disrupt DC function. HCV NS3/4A protease has been shown to block signaling through TLR3, TLR4 and RIG-I and consequently IFN- α production by infected cells and in infected tissues (20, 27). Finally, it is possible that inhibition of DC function and response to TLR ligands may lead to exhaustion of CD8⁺ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection but only in a limited subset of patients that are susceptible to higher levels of functional impairment (36).

In conclusion, this is the first comprehensive longitudinal analysis of DC function during acute HCV infection. We reported that mDCs and pDCs from resolvers are hyperresponsive to TLR

stimulation and upregulate DC maturation markers regardless of the phase of HCV infection. However, mDCs from all HCV patients, irrespective of the outcome, were functionally hyperresponsive as they produced higher levels of several cytokines during the early acute phase of HCV infection, but that mDC function returned to levels similar to healthy donors with chronic evolution. These results suggest that DCs are activated *in vivo* early during acute HCV but persistent infection might dampen their function. We propose that sustained mDC and pDC hyperresponsiveness is associated with spontaneous resolution and is essential to maintenance of an efficient antiviral response and prevention of viral recurrence. Future studies are required to understand the mechanisms by which DCs become hyperresponsive during acute HCV.

Acknowledgments

This work is supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (MOP-103138, MOP-210232 and HEO-115696), Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI) and the National Institute on Drug Abuse (NIDA) funded International Collaboration of Incident HIV and Hepatitis C in Injecting Cohorts (InC3) study (R01DA031056). S. Pelletier received a doctoral fellowship from the National CIHR Research Training Program in Hepatitis C (NCRTP-Hep C). N. H. Shoukry, P. Ancuta and J. Bruneau hold Chercheur Boursier salary awards from the FRQS.

Table and figures

Table I^{m2}: Demographics and Characteristics of patients and donors.

	n	Gender (M/F)	Age (median yr)	Genotype 1/2/3/NA
HCV chronic evolution	15	14/1	35	4/0/6/5
HCV spontaneous resolution	10	7/3	30	1/2/3/4
Healthy donors	15	10/5	32	N/A

NA: not available

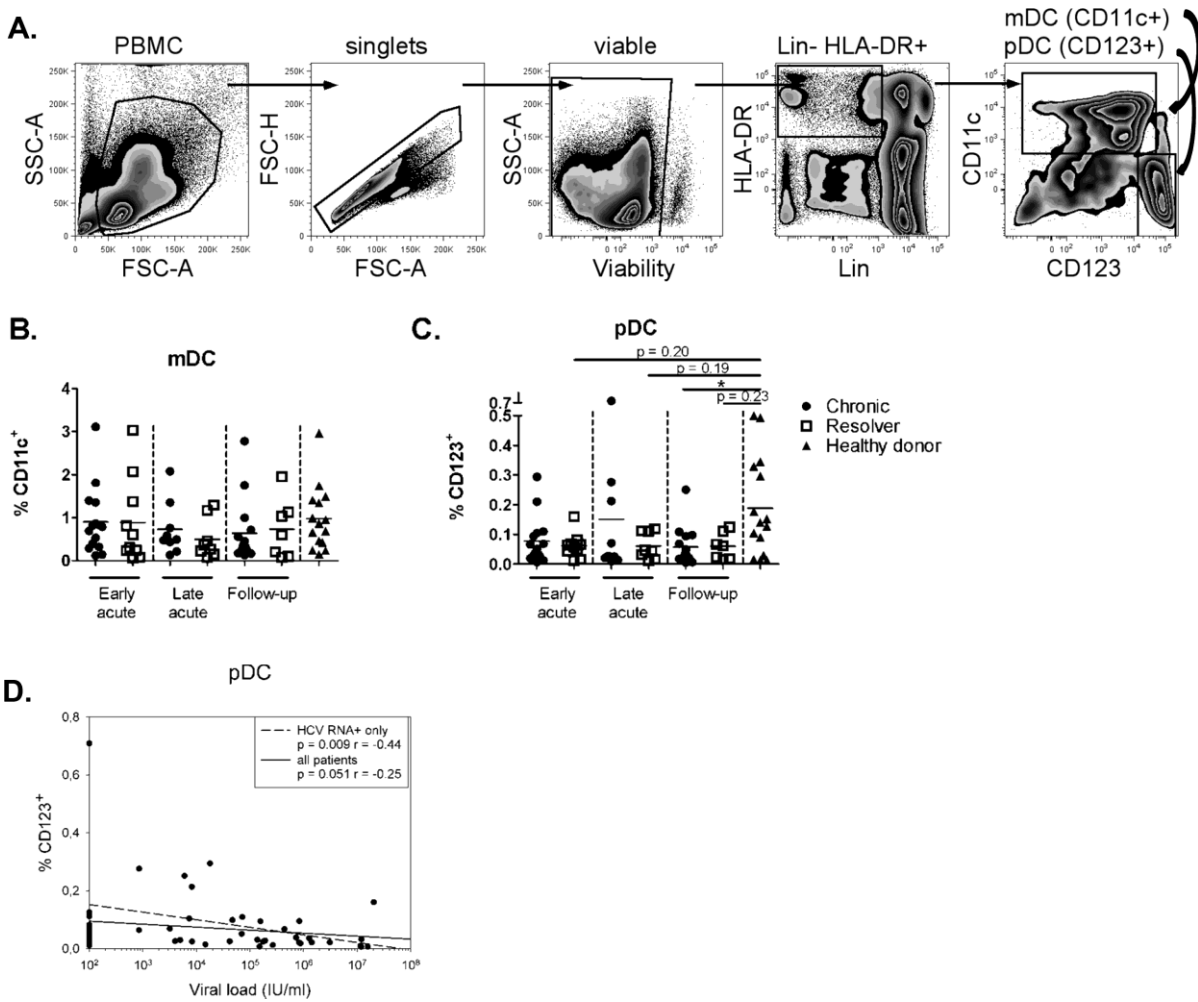


Figure 1^{m2} : Decreased pDC frequency during acute HCV with chronic evolution.

(A) Strategy for gating on the two DC subsets: Lin⁻HLA-DR⁺CD11c⁺ mDCs and Lin⁻HLA-DR⁺CD11c⁻CD123⁺ pDCs (Lin⁻ : CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻ and CD56⁻). Frequency of (B) CD11c⁺ mDCs and (C) CD123⁺ pDCs was determined *ex vivo* in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (□) and healthy donors (▲). Mean is represented by a horizontal bar. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors). (D) Spearman correlation between plasma viral load and frequency of CD123⁺ pDCs in patients with HCV chronic evolution and HCV spontaneous resolution, during the early acute, late acute and follow-up phases. Plasma viral load was measured by in house qRT-PCR. Dashed line represents

correlation with patients who have detectable HCV RNA only (> 100 IU/ml) and solid line represents correlation with all patients.

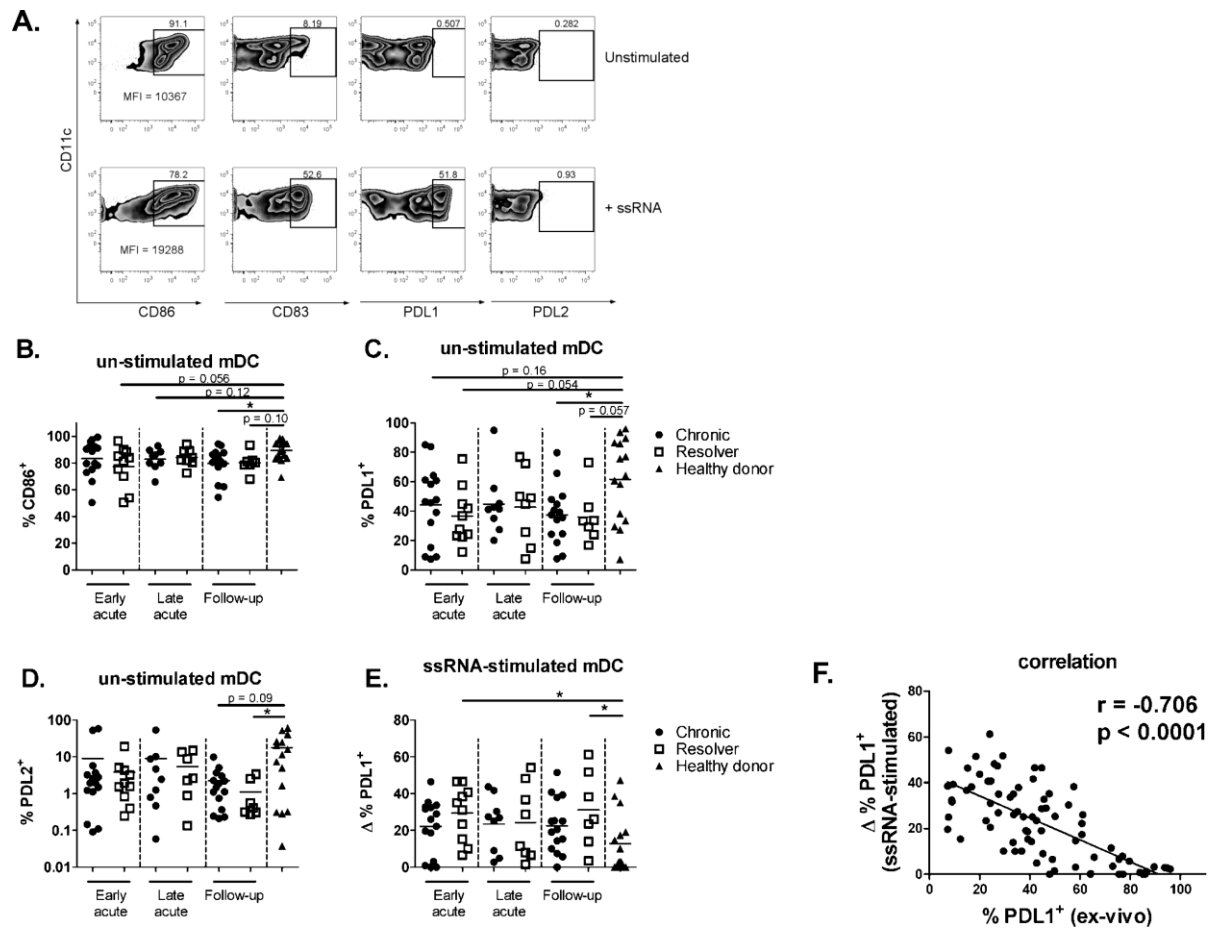


Figure 2^{m2} : mDC immature phenotype is associated with evolution of infection irrespective of outcome.

(A) Representative dot plot for phenotypic characterization of DCs. Top row represents un-stimulated DCs and bottom row represents DCs stimulated with ssRNA for 24h. Surface expression of maturation markers were studied in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (□) and healthy donors (▲). Frequency of CD86⁺ (B), PDL1⁺ (C) and PDL2⁺ (D) un-stimulated mDCs. (E) Frequency of ΔPDL1⁺ ssRNA-stimulated mDCs (baseline expression was subtracted from expression in the presence of TLR ligands). Mean is represented by a horizontal bar. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors). (F) Spearman correlation between PDL1 expression by un-stimulated mDCs (panel C) and ssRNA-stimulated mDCs (panel E).

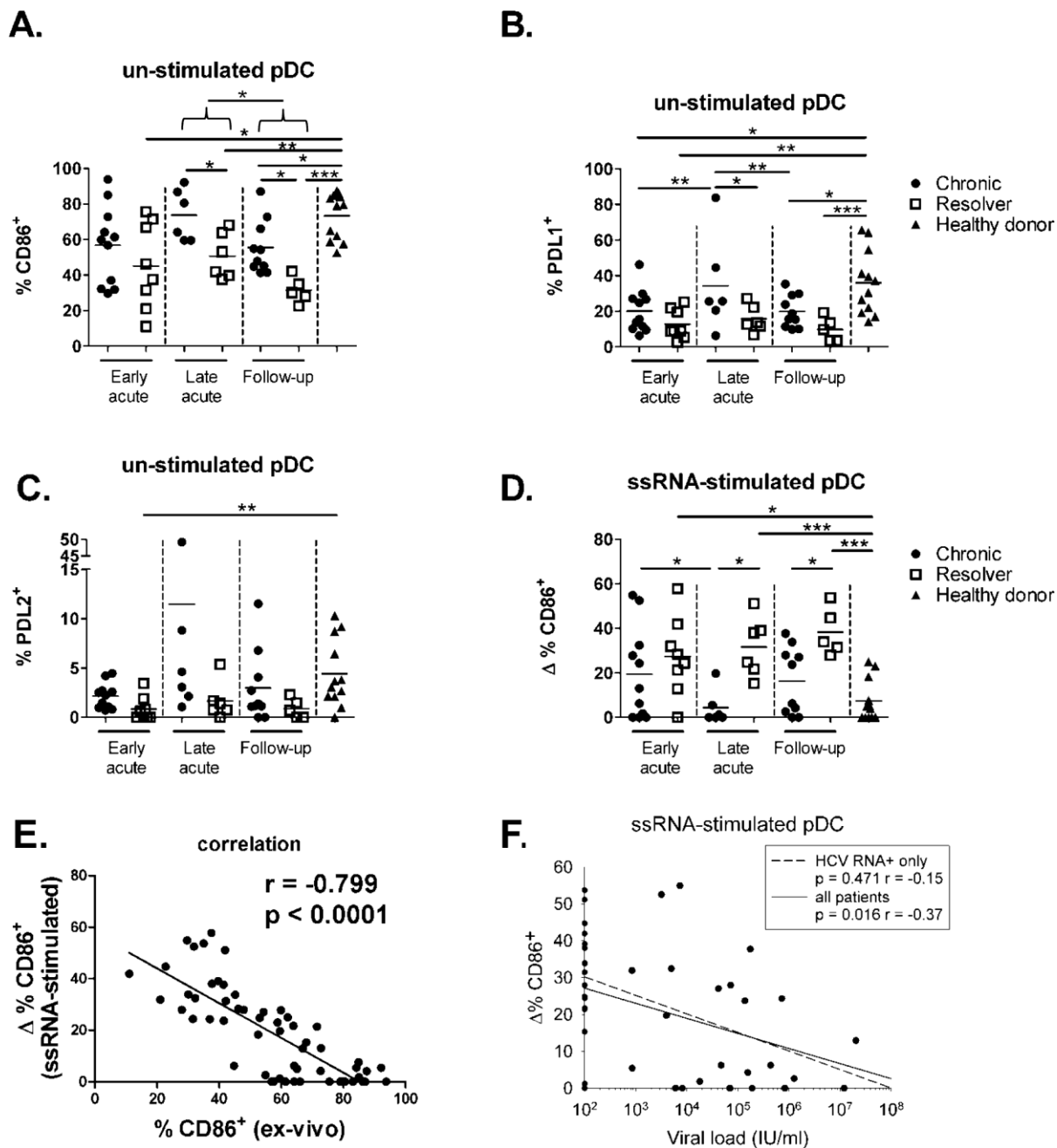


Figure 3^{m2} : pDC immature phenotype is associated with spontaneous resolution.

Surface expression of maturation markers were studied in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (□) and healthy donors (▲). Frequency of CD86⁺ (A), PDL1⁺ (B) and

PDL2⁺ (C) un-stimulated pDCs. (D) Frequency of Δ CD86⁺ ssRNA-stimulated pDCs (baseline expression was subtracted from expression in the presence of TLR ligands). Mean is represented by a horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors). (E) Pearson correlation between CD86 expression by un-stimulated pDCs (panel A) and ssRNA-stimulated pDCs (panel D). (F) Spearman correlation between plasma viral load and Δ CD86⁺ ssRNA-stimulated pDCs in patients with HCV chronic evolution and HCV spontaneous resolution, during the early acute, late acute and follow-up phases. Plasma viral load was measured by in house qRT-PCR. Dashed line represents correlation with patients who have detectable HCV RNA only (> 100 IU/ml) and solid line represents correlation with all patients.

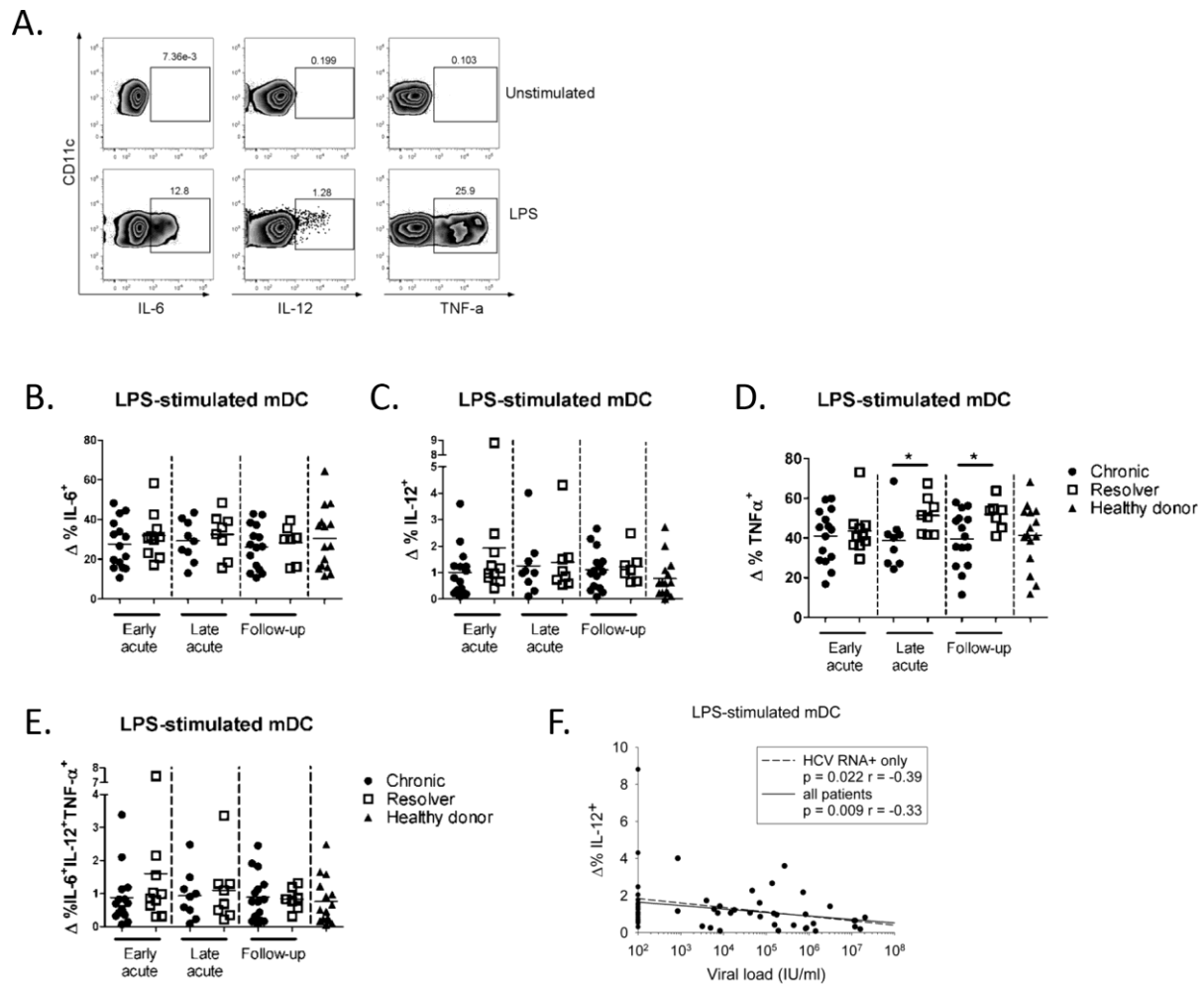


Figure 4^{m2}: Increased cytokine production in response to TLR4 ligand is associated with spontaneous resolution.

(A) Representative dot plot for functional characterization of mDCs. Top row represents un-stimulated mDCs and bottom row represents mDCs stimulated with LPS for 6h. (B-E) Intracellular expression of cytokines were studied in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (□) and healthy donors (▲). Baseline expression was subtracted from expression in the presence of TLR ligands. Frequency of total Δ IL-6⁺ (B), Δ IL-12⁺ (C) and Δ TNF α ⁺ mDCs (D) in response to LPS stimulation. (E) Frequency of Δ IL-6⁺IL-12⁺TNF α ⁺ mDCs in response to LPS. Mean is represented by a

horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors). (F) Spearman correlation between plasma viral load and Δ IL-12⁺ LPS-stimulated mDCs in patients with HCV chronic evolution and HCV spontaneous resolution, during the early acute, late acute and follow-up phases. Plasma viral load was measured by in house qRT-PCR. Dashed line represents correlation with patients who have detectable HCV RNA only (> 100 IU/ml) and solid line represents correlation with all patients.

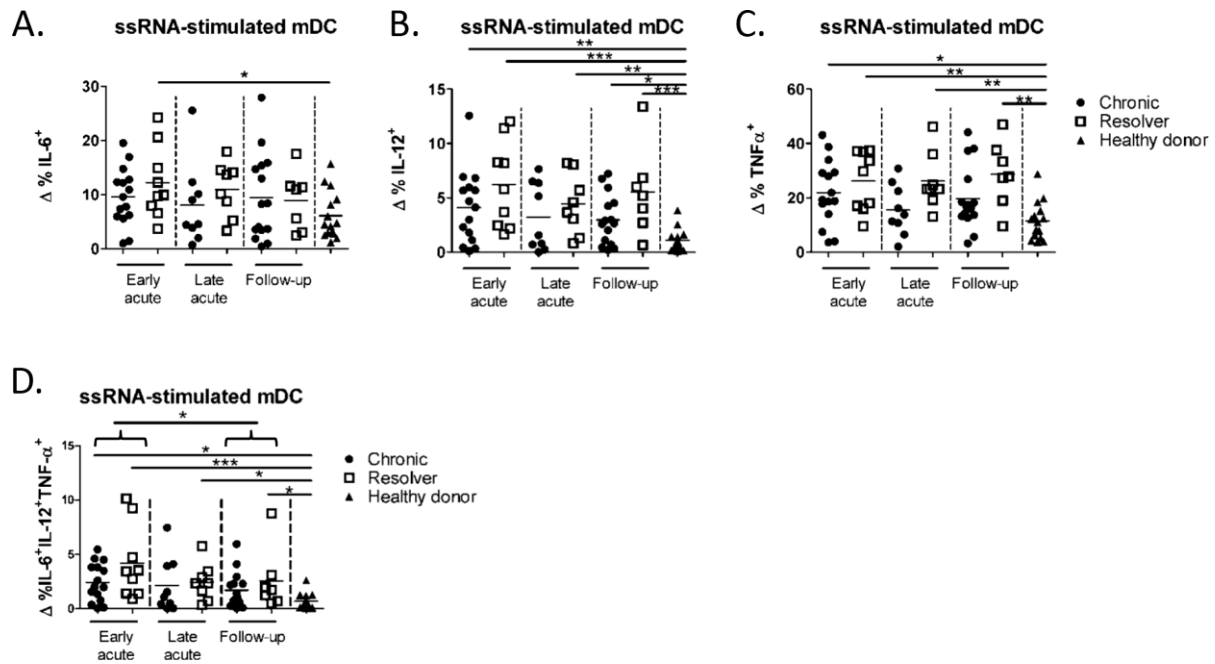


Figure 5^{m2} : Increased cytokine production in response to TLR7/8 ligand is associated with spontaneous resolution.

Intracellular expression of cytokines were studied in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (□) and healthy donors (▲). Baseline expression was subtracted from expression in the presence of TLR ligands. Frequency of total Δ IL-6⁺ (A), Δ IL-12⁺ (B) and Δ TNFα⁺ (C) ssRNA-stimulated mDCs. Frequency of Δ IL-6⁺IL-12⁺TNFα⁺ mDCs (D) in response to ssRNA stimulation. Mean is represented by a horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors).

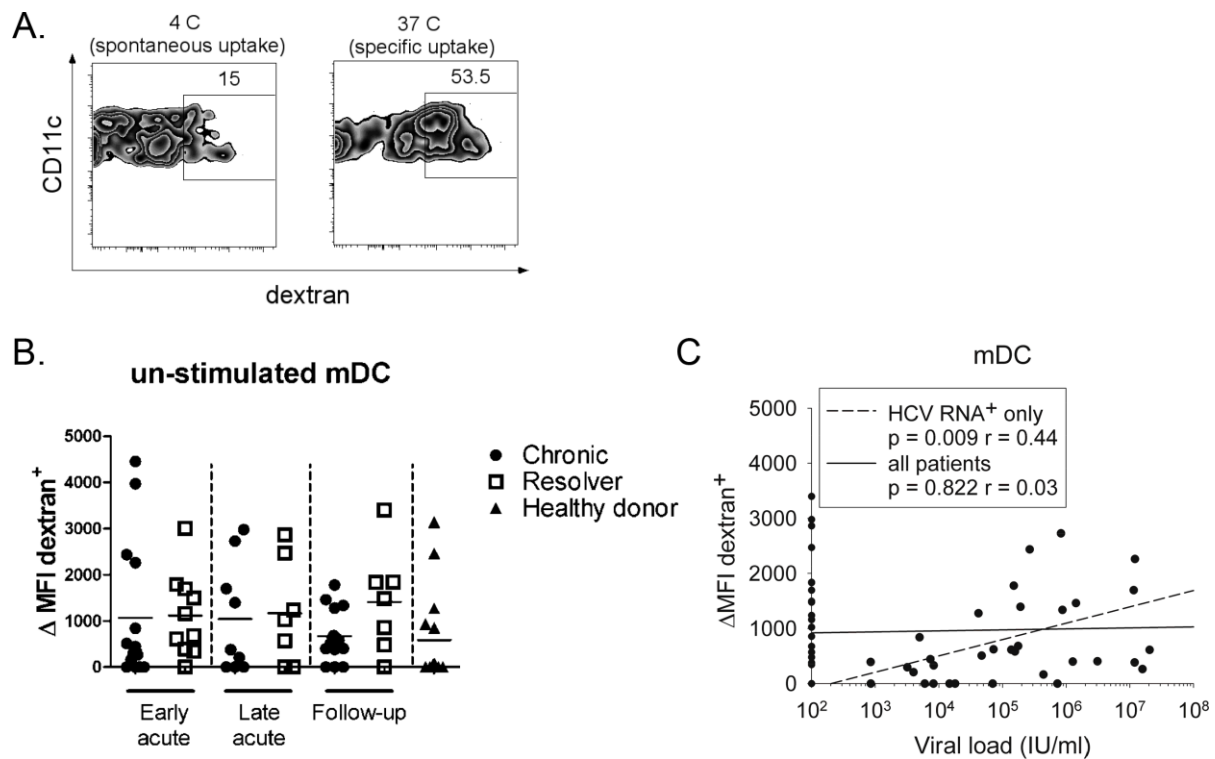


Figure 6^{m2} : Figure 6. Viral load correlates with increased mDC antigen uptake.

(A) Representative dot plot for antigen uptake functional assay. Left panel represents PBMCs incubated with FITC-coupled dextran beads at 4°C (baseline spontaneous uptake) and right panel represents PBMCs incubated at 37°C (specific uptake). (B) Δ MFI dextran⁺ mDCs in patients with HCV chronic evolution (●), HCV spontaneous resolution (□) and healthy donors (▲) (background uptake was subtracted from specific uptake). Mean is represented by a horizontal bar. Two-way ANOVA (repeated measures) or one-way ANOVA (comparison with healthy donors). (C) Spearman correlation between viral load and Δ MFI dextran⁺ mDCs in patients with HCV chronic evolution and HCV spontaneous resolution, during the early acute, late acute and follow-up phases. Plasma viral load was measured by in house qRT-PCR. Dashed line represents correlation with patients who have detectable HCV RNA (> 100 IU/ml) and solid line represents correlation with all patients.

References

1. **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.
2. **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.
3. **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.
4. **Badr, G., N. Bedard, M. S. Abdel-Hakeem, L. Trautmann, B. Willems, J. P. Villeneuve, E. K. Haddad, R. P. Sekaly, J. Bruneau, and N. H. Shoukry.** 2008. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory T cells. *J Virol* **82**:10017-10031.
5. **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.
6. **Bigger, C. B., K. M. Brasky, and R. E. Lanford.** 2001. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* **75**:7059-7066.
7. **Bigger, C. B., B. Guerra, K. M. Brasky, G. Hubbard, M. R. Beard, B. A. Luxon, S. M. Lemon, and R. E. Lanford.** 2004. Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol* **78**:13779-13792.
8. **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**:1365-1371.
9. **Chang, K. M.** 2007. Regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *Hepatology Res* **37 Suppl 3**:S327-330.
10. **Chung, H., T. Watanabe, M. Kudo, and T. Chiba.** 2010. Hepatitis C virus core protein induces homotolerance and cross-tolerance to Toll-like receptor ligands by activation of Toll-like receptor 2. *The Journal of infectious diseases* **202**:853-861.
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. **Dolganiuc, A., S. Oak, K. Kodys, D. T. Golenbock, R. W. Finberg, E. Kurt-Jones, and G. Szabo.** 2004. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* **127**:1513-1524.
13. **Dolganiuc, A., E. Paek, K. Kodys, J. Thomas, and G. Szabo.** 2008. Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes. *Gastroenterology* **135**:2119-2127.
14. **Dolganiuc, A., and G. Szabo.** 2011. Dendritic cells in hepatitis C infection: can they (help) win the battle? *J Gastroenterol* **46**:432-447.

15. **Duesberg, U., A. von dem Bussche, C. Kirschning, K. Miyake, T. Sauerbruch, and U. Spengler.** 2002. Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)--core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunology letters* **84**:89-95.
16. **Feld, J.** 2012. Plasma IP10 level predicts spontaneous clearance in acute HCV infection. EASL International Liver Congress.
17. **Galle, M. B., R. M. DeFranco, D. Kerjaschki, R. G. Romanelli, P. Montalto, P. Gentilini, M. Pinzani, and P. Romagnoli.** 2001. Ordered array of dendritic cells and CD8+ lymphocytes in portal infiltrates in chronic hepatitis C. *Histopathology* **39**:373-381.
18. **Goutagny, N., C. Vieux, E. Decullier, B. Ligeoix, A. Epstein, C. Trepo, P. Couzigou, G. Inchauspe, and C. Bain.** 2004. Quantification and functional analysis of plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases* **189**:1646-1655.
19. **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. *J Virol* **75**:5550-5558.
20. **Hoofnagle, J. H.** 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* **36**:S21-29.
21. **Horner, S. M., and M. Gale, Jr.** 2009. Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **29**:489-498.
22. **Ida, J. A., N. Shrestha, S. Desai, S. Pahwa, W. A. Hanekom, and P. A. Haslett.** 2006. A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *J Immunol Methods* **310**:86-99.
23. **Joffre, O., M. A. Nolte, R. Sporri, and C. Reis e Sousa.** 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* **227**:234-247.
24. **Kaiko, G. E., J. C. Horvat, K. W. Beagley, and P. M. Hansbro.** 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* **123**:326-338.
25. **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. *J Immunol* **162**:5584-5591.
26. **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. *The Journal of infectious diseases* **190**:1919-1926.
27. **Kanto, T., M. Inoue, M. Miyazaki, I. Itose, H. Miyatake, M. Sakakibara, T. Yakushijin, A. Kaimori, C. Oki, N. Hiramatsu, A. Kasahara, and N. Hayashi.** 2006. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology* **49**:58-63.
28. **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.
29. **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. *The Journal of infectious diseases* **192**:497-503.

30. **Manigold, T., and V. Racanelli.** 2007. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *The Lancet infectious diseases* **7**:804-813.
31. **Mansour, H., M. E. Laird, R. Saleh, A. Casrouge, N. S. Eldin, S. El Kafrawy, M. Hamdy, J. Decalf, B. R. Rosenberg, A. Fontanet, M. Abdel-Hamid, M. K. Mohamed, M. L. Albert, and M. Rafik.** 2010. Circulating plasmacytoid dendritic cells in acutely infected patients with hepatitis C virus genotype 4 are normal in number and phenotype. *The Journal of infectious diseases* **202**:1671-1675.
32. **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.
33. **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.
34. **Rehermann, B.** 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* **119**:1745-1754.
35. **Rodrigue-Gervais, I. G., L. Jouan, G. Beaulé, D. Sauve, J. Bruneau, B. Willems, R. P. Sekaly, and D. Lamarre.** 2007. Poly(I:C) and lipopolysaccharide innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in hepatitis C virus-infected patients. *J Virol* **81**:5537-5546.
36. **Roederer, M., J. L. Nozzi, and M. C. Nason.** 2011. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **79**:167-174.
37. **Sabado, R. L., M. O'Brien, A. Subedi, L. Qin, N. Hu, E. Taylor, O. Dibben, A. Stacey, J. Fellay, K. V. Shianna, F. Siegal, M. Shodell, K. Shah, M. Larsson, J. Lifson, A. Nadas, M. Marmor, R. Hutt, D. Margolis, D. Garmon, M. Markowitz, F. Valentine, P. Borrow, and N. Bhardwaj.** 2010. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* **116**:3839-3852.
38. **Sandler, N. G., C. Koh, A. Roque, J. L. Eccleston, R. B. Siegel, M. Demino, D. E. Kleiner, S. G. Deeks, T. J. Liang, T. Heller, and D. C. Douek.** 2011. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* **141**:1220-1230, 1230 e1221-1223.
39. **Sarasin-Filipowicz, M., E. J. Oakeley, F. H. Duong, V. Christen, L. Terracciano, W. Filipowicz, and M. H. Heim.** 2008. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:7034-7039.
40. **Stiffler, J. D., M. Nguyen, J. A. Sohn, C. Liu, D. Kaplan, and C. Seeger.** 2009. Focal distribution of hepatitis C virus RNA in infected livers. *PLoS One* **4**:e6661.
41. **Su, A. I., J. P. Pezacki, L. Wodicka, A. D. Brideau, L. Supekova, R. Thimme, S. Wieland, J. Bukh, R. H. Purcell, P. G. Schultz, and F. V. Chisari.** 2002. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15669-15674.
42. **Swiecki, M., Y. Wang, W. Vermi, S. Gilfillan, R. D. Schreiber, and M. Colonna.** 2011. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med* **208**:2367-2374.

43. **Takahashi, K., S. Asabe, S. Wieland, U. Garaigorta, P. Gastaminza, M. Isogawa, and F. V. Chisari.** 2010. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:7431-7436.
44. **Tanimoto, K., S. M. Akbar, K. Michitaka, N. Horiike, and M. Onji.** 2001. Antigen-presenting cells at the liver tissue in patients with chronic viral liver diseases: CD83-positive mature dendritic cells at the vicinity of focal and confluent necrosis. *Hepatology* **21**:117-125.
45. **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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15661-15668.
46. **Wang, J. C., J. J. Kobie, L. Zhang, M. Cochran, T. R. Mosmann, C. T. Ritchlin, and S. A. Quataert.** 2009. An 11-color flow cytometric assay for identifying, phenotyping, and assessing endocytic ability of peripheral blood dendritic cell subsets in a single platform. *J Immunol Methods* **341**:106-116.
47. **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. *J Immunol* **169**:3447-3458.
48. **Wertheimer, A. M., A. Bakke, and H. R. Rosen.** 2004. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology* **40**:335-345.

SECTION 5: MANUSCRIT 3

Cross-Talk between Natural Killer and Dendritic Cells is Intact during Acute and Chronic HCV Infection

Manuscript in preparation.

Sandy Pelletier^{1,3}, Anne-Sophie Dugast², Galit Alter², Petronela Ancuta^{1,3}, Bernard Willems^{1,5}, Julie Bruneau^{1,4}, Naglaa H. Shoukry^{1,5}

¹Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital St-Luc, Montréal, QC, Canada, ²Ragon Institute of MGH, MIT, and Harvard, Charlestown, MA, USA, ³Département de microbiologie et immunologie, ⁴Département de médecine familiale and ⁵Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Address Correspondence and Reprint Requests to: Dr. Naglaa H. Shoukry, Centre de Recherche du CHUM, Hôpital St-Luc, 264 boul. René-Lévesque Est, Local PEA-316 Montréal (Québec) H2X 1P1, CANADA

S. Pelletier est responsable en totalité de la réalisation des travaux de recherche. P. Ancuta a fourni des réactifs. P. Ancuta, A.-S. Dugast et G. Alter ont apporté une contribution intellectuelle. B. Willems et J. Bruneau a contribué à l'obtention des échantillons cliniques utilisés pour les travaux de recherche. S. Pelletier est responsable de la réalisation des figures du manuscrit, ainsi que des statistiques. S. Pelletier et N. Shoukry sont responsables de la planification des travaux et de l'écriture de ce manuscrit. N. Shoukry a supervisé l'ensemble de l'étude.

Abbreviations

7-AAD , 7-amino-actinomycin D; aNK, activated NK cells; ANOVA, analysis of variance; CD, cluster of differentiation; DCs, dendritic cells ; DR4, death receptor 4; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FBS, fetal bovine serum; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus ; HIV, human immunodeficiency virus; HLA, human leucocyte antigen; IDU, intravenous drug user; IFN, interferon; IL, interleukin; iDC, immature DC; KIR, killer immunoglobulin-like receptor; LPS, lipopolysaccharide; mDC, mature dendritic cell; MDDC, monocyte derived dendritic cell; MHC, major histocompatibility complex; MICA/B, MHC class I chain-related genes A/B; NK cells, natural killer cells; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; pDC, plasmacytoid dendritic cell; rNK, resting NK cells; ssRNA, single stranded RNA; TGF, transforming growth factor; Th, T helper ; TLR, toll-like receptor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; TNF, tumor necrosis factor

Abstract

Several studies have reported that dendritic cells (DCs) are dysfunctional and that natural killer (NK) cells produce less antiviral cytokines during chronic hepatitis C virus (HCV) infection. NK cells and DCs are both part of the innate immune response that fights against infections and they also interact with each other to potentiate their effector functions. Therefore, it is possible that NK/DC cross-talk might be implicated in the skewed function of these cells during chronic HCV evolution, and might also lead to the inefficient HCV-specific T cell responses associated with HCV chronic evolution. We performed a cross-sectional study examining the NK/DC cross-talk during acute and chronic HCV infection, after spontaneous resolution of the virus and in uninfected controls. We first studied the capacity of activated NK cells to kill potentially tolerogenic immature DCs and we observed no major differences between different stages of HCV infection and uninfected controls. We also demonstrated that the capacity of mature DCs to activate resting NK cells, as measured by NK cell cytokine production (IFN- γ and TNF- α) and degranulation (CD107a) against target cells, is intact during different stages of HCV infection. However, we observed that mature DCs induced a lower frequency of IFN- γ mono-producing NK cells (CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) in all stages of HCV infection and in exposed uninfected patients as compared to healthy donors. The frequency of these IFN- γ mono-producing NK cells accounts for a small fraction of total NK cells, so their impact on the total NK cell response might be minor. Finally, we obtained unprecedented data which suggests that immature DCs have the capacity to inhibit NK cell function as they were able to inhibit NK cell spontaneous cytokine production and degranulation against target cells. In conclusion, the NK/DC cross-talk is globally intact during different stages of HCV infection and other mechanisms are probably responsible for the failure to sustain HCV-specific T cell responses during chronic HCV.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) causes chronic infection and liver disease in the majority of infected individuals (20). Those that spontaneously resolve from acute HCV develop a robust and sustained HCV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell response but the mechanisms leading to this sustained immune response during resolution but not chronic evolution remain unknown (39). Natural killer (NK) cells are the most important effector population of the innate immune response. They are able to kill tumor and infected cells, and secrete several cytokines with immuno-modulatory and anti-viral properties. NK cell effector functions are regulated by a delicate balance between positive and negative signals coming from activating and inhibitory receptors. Dendritic cells (DCs) are critical for initiating adaptive immune responses. Under normal conditions, DCs are in an immature state and they continuously sample the environment for the presence of pathogens. Upon activation by danger signals, DCs up-regulate costimulatory molecules and migrate to lymph nodes where they present antigenic peptides to T cells and prime the adaptive immune response. NK cells and DCs not only act independently but also interact with each other to further potentiate their efficiency and regulate the adaptive response. Indeed, NK cells have been shown to induce DC maturation (16) but also kill immature DCs to limit the development of tolerogenic DCs (14, 38). Mature DCs are also able to activate NK cells to further enhance their effector functions (14, 16).

NK cell-mediated killing of DCs is termed DC editing. Several studies suggest that NK cells control the DC population by eliminating tolerogenic DCs that may occur when DCs take up antigens or apoptotic bodies in the absence of “danger signals” and do not fully mature. This prevents the development of tolerant responses and allows only immunogenic DCs to reach secondary lymphoid tissues (14, 38). NK cell-mediated killing of DCs usually occurs at high NK:DC ratios. It is contact-dependent and engages both inhibitory and activating NK cell receptors. A subset of NK cells express the inhibitory receptor NKG2A that binds to HLA-E. By expressing low levels of MHC class I and consequently HLA-E, immature DCs are susceptible to NK-mediated elimination. On the other hand, mature DCs that have encountered pathogens up-regulate MHC molecules and are resistant to NK cell-mediated killing. In addition to KIR-HLA interactions, DC editing is dependent on the activating NK

cell receptors NKp30, NKp46 and DNAM-1 (14, 37, 43). Once these receptors are engaged, NK cells induce apoptosis of immature DCs through the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-death receptor 4 (DR4) pathway (19, 29) or by perforin-dependent mechanisms (24).

Furthermore, mature DCs are capable of activating resting NK cells. This activation is thought to pre-activate or prime NK cells in order for them to fully accomplish their effector functions by killing infected cells and secreting cytokines. DC priming of NK cells is primarily cytokine-dependent. Type I IFNs are mainly produced by plasmacytoid DCs (pDCs) but also by myeloid DCs, and predominately trigger NK cell cytotoxicity (17, 33). IL-12 and IL-18 produced by DCs mainly induce IFN- γ secretion by NK cells (13), while IL-15 trans-presentation by IL-15R α on DCs is crucial for NK cell survival and proliferation (7, 13, 21). Although DC priming of NK cells mostly depends on cytokines, cell-to-cell contact is important for directed secretion of these DC-derived cytokines (5, 42). Furthermore, other contact-dependent mechanisms including NKG2D recognition of its ligands on DCs have been shown to be important for DC activation of NK cells (23).

Several studies suggest that the NK/DC cross-talk is defective during microbial infections (12, 22, 26, 32, 41). In humans, it has been well described during human immunodeficiency virus (HIV) infection. First, Mavilio *et al.* (28) have demonstrated that mature DCs from viremic HIV-infected individuals have reduced capacity to activate resting NK cells and this was due to reduced cytokine production by DCs. Furthermore, activated NK cells from chronic HIV-infected individuals are also defective in eliminating immature DCs and this is probably related to low NKp30 and TRAIL expression and function (28, 45). These findings were further supported by studies demonstrating defective NK cell-mediated killing of *in vitro* HIV-infected DCs (3, 29). These studies suggest that the NK/DC cross-talk can be affected by chronic viral infections.

The NK/DC cross-talk has been poorly studied in the context of HCV infection, especially during the acute phase. However, studies examining NK cell and DC phenotype and function during acute and chronic HCV suggest that the NK/DC cross-talk might be of interest. First, high frequency of NKp30⁺ NK cells is associated with protection from HCV infection (18), while low frequency of NKp30⁺ NK cells is associated with spontaneous clearance of acute HCV (2). Because of the involvement of NKp30 in the NK/DC cross-talk, the differential NKp30 expression observed provides a rationale for studying the

NK/DC cross-talk during HCV infection. Second, we and others have demonstrated increased NK cell cytotoxicity during acute HCV irrespective of infection outcome as compared to uninfected controls (2, 4, 36). Increased NK cell cytotoxicity has also been described during chronic HCV in some studies (1, 30, 35). Furthermore, studies examining NK cell cytokine production yielded conflicting results, but there is a general consensus that NK cells produce less IFN- γ but more Th2 cytokines during chronic HCV (8), and we have also confirmed reduced IFN- γ production during acute HCV (36). Similarly, defects in DC cytokine production and induction of allogenic T cell responses have been demonstrated in some but not all individuals with chronic HCV infection (11). However during acute HCV, we have demonstrated that DCs were hyperresponsive to Toll-like receptor (TLR) stimulation during acute HCV infection but this hyperresponsiveness was maintained only in individuals who spontaneously cleared their HCV infection (manuscript in revision). Therefore, it is possible that the NK/DC cross-talk might be implicated in the skewed function of NK cells and DCs observed during acute or chronic HCV. Furthermore, defects in the NK/DC cross-talk might also lead to inefficient HCV-specific T cell responses associated with HCV chronic evolution.

In this cross-sectional study we used multiparametric flow cytometry to monitor the NK/DC cross-talk in a cohort of intravenous drug users during different stages of HCV infection. We have demonstrated that NK cell-mediated killing of immature DCs is intact during acute and chronic HCV infection. We have also observed that mature DCs activated resting NK cells, as they induced NK cell cytokine production and degranulation against target cells, during different stages of HCV infection. Furthermore, we have described for the first time the capacity of immature DCs to inhibit resting NK cell function. Globally, our results suggest no major defects in the NK/DC cross-talk during HCV infection.

Patients and Methods

Study subjects and clinical follow-up.

A total of 27 HCV infected individuals and 20 uninfected individuals were included in this study. HCV infected subjects were recruited among high-risk IDUs participating in the Montreal Acute HepC cohort study (HEPCO) and the Hepatology clinic at St-Luc hospital of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). This study was approved by the institutional ethics committee (Protocols # SL05.014 and SL05.025) and conducted according to the Declaration of Helsinki. All participants signed informed consent upon enrolment. HCV infected individuals were divided into 3 groups: acute infection (n = 7), spontaneous resolution (n = 10) and chronic infection (n = 10). Primary acute HCV infection (n = 6) was defined as detection of positive HCV RNA and/or HCV antibodies following a previous negative test in the past 6 months, or positive HCV RNA with concomitant negative HCV antibodies tests. Acute re-infection (n = 1) was defined as detection of positive HCV RNA and HCV antibodies following 3 consecutive negative monthly tests in the past 6 months. The mean follow-up interval between the last aviremic and the first viremic time point was 2.4 months (range: 1-25 weeks), and the estimated time of infection was defined as the median between the last aviremic and the first viremic time point. Duration of infection was defined as the time (in months) post estimated time of infection. Spontaneous resolution was defined as negative HCV RNA and positive HCV antibodies, while chronic infection was defined as positive HCV RNA and HCV antibodies. Spontaneous resolvers had resolved for more than 2 years, while chronics were infected for more than 2 years. Uninfected individuals were divided into 2 groups: healthy donors (n = 10) and high-risk IDUs (n = 10). All patients tested negative for HIV and hepatitis B virus (HBV), and were either medically ineligible or declined IFN therapy.

HCV RNA testing and quantification.

Qualitative HCV RNA tests were performed using an automated COBAS AmpliPrep/COBAS Amplicor HCV test, version 2.0 (sensitivity, 50 IU/ml) (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). HCV genotyping was done using standard sequencing for the NS5B region, and was performed by

the Laboratoire de Santé Publique du Québec (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) as part of the clinical follow-up of patients.

Generation of MDDCs and isolation and culture of NK cells.

To generate monocyte-derived DCs (MDDCs), monocytes were isolated from fresh PBMCs by positive magnetic selection (CD14 Microbeads, Myltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes were then cultured at $1-2 \times 10^6$ cells/ml in DC complete media [RPMI (Life Technologies), 2% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 2.4 mg/ml hepes (all from Life Technologies, Burlington, ON, Canada)] supplemented with 20 ng/ml IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) and 1500 U/ml GM-CSF (Argos Therapeutics, Durham, NC, USA). The FBS lot used was tested and shown not to induce non-specific DC maturation. Fresh complete media and cytokines were added on day 2 and 4. On day 5, purity of immature MDDCs was routinely 80%-98%. For simplicity, MDDCs will be further referred as DCs.

NK cells were freshly isolated from monocyte-depleted PBMCs by negative magnetic selection (NK cell isolation kit, Myltenyi Biotec). NK cells were then cultured at 1×10^6 cells/ml in NK cell complete media [RPMI, 5% human serum (Sigma), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, non essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate (all from Life Technologies) and 5×10^{-5} M β-mercaptoethanol (Sigma)]. Resting NK (rNK) cells were cultured with 12 or 25 IU/ml IL-2 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Germantown, MD) and activated NK (aNK) cells with 250 IU/ml IL-2 for 5 or 6 days. Fresh complete media and cytokine was added on day 3. Purity of NK cells after culture period was routinely 82%-99%.

Flow cytometry antibodies and reagents.

Directly conjugated antibodies against the following molecules were used: CD3 Pacific Blue (clone SP34-2), CD14 Alexa700 (clone M5E2), CD16 APC-H7 (clone 3G8), CD56 PE-Cy7 (clone B159), CD107a PE-Cy5 (clone H4A3), HLA-DR APC-H7 (clone L243), IFN-γ FITC (clone 25723.11), TNF-α Alexa700 (clone MAb11) (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA); CD11c Pacific Blue (clone Bu15), CD83 Alexa488 (clone HB15e) (both from Biolegend, San Diego, CA, USA); IL-15 PE (clone 34559) (from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); IL-15Rα FITC (clone eBioJM7A4) (from

eBiosciences, San Diego, CA, USA); CD69 ECD (clone TP1.55.3) (from Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). Live cells were identified using PE AnnexinV Apoptosis Detection Kit I (BD) or an Aqua Live/Dead fixable dead cell Stain Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. "Fluorescence minus one" control stains were used to determine background levels of staining. Multiparameter flow cytometry was performed using a standard BD LSR II instrument equipped with blue (488 nm), red (640 nm), violet (405 nm) and yellow-green lasers (561nm) (BD Biosciences) to systematically perform seven-color staining using FACSDiva software (version 5) (BD Biosciences). Compensation was performed with single fluorochromes and BD CompBeads (BD Biosciences). Data files were analyzed using FlowJo software, version 9.4.10 for Mac (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Polyfunctional data were exported using Boolean gates in FlowJo and further analyzed using PESTLE software (version 1.6.2) and SPICE software (version 5.22) obtained from M. Roederer, National Institutes of Health, Bethesda, MD (40).

Assessment of NK cell-mediated killing of DCs by flow cytometry.

Day 5 immature DCs (iDCs) were matured with 1 µg/ml LPS (*E. Coli* 026:B6; Sigma-Aldrich) for 24 h (mDCs). rNK cells, aNK cells, iDCs and mDCs were washed and resuspended at 1×10^6 cells/ml in DC complete medium supplemented with non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 5×10^{-5} M β-mercaptoethanol. NK cells and DCs were co-cultured at a NK:DC ratio of 5:1 for 24 h in a 96-well plate. Cells were then stained with surface antibodies for 30 min at 4°C, washed twice in fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer [1× phosphate-buffered saline (PBS), 1% FBS, 0.02% NaN_3], and then stained with 7-amino-actinomycin D (AAD) and annexinV according to the manufacturer's protocol [PE AnnexinV Apoptosis Detection Kit I (BD)]. Viable DCs were identified as $\text{HLA-DR}^+7\text{-AAD}^- \text{AnnexinV}^-$. NK cells were excluded by FSC/SSC properties (Figure 1C).

Assessment of DC-mediated activation of rNK cells by flow cytometry.

Day 5 iDCs were matured with 1 µg/ml LPS or 5 µg/ml ssRNA40/LyoVec (Invivogen, San Diego, CA, USA) for 6 h. rNK cells, iDCs and mDCs were washed and resuspended at 1×10^6 cells/ml in NK cell complete media. NK cells and DCs were co-cultured at a NK:DC ratio of 1:1 for 16 h in a 96-well plate. In parallel, NK cells were cultured with 1 ng/ml IL-15 (Peprotech), 20 ng/ml IL-12

(Peprotech) or a combination of both IL-15 and IL-12 in order to assess NK cell response to exogenous cytokines. Cells were then washed and were incubated with anti-CD107a antibody and either culture medium as a negative control, or K562 leukemia target cell line at a ratio of 1:1 (ATCC, Manassas, VA, USA) in NK cell complete media. Following 1 h of stimulation, 10 µg/ml of brefeldinA (Sigma–Aldrich) and 6 µg/ml of monensin sodium salt (Sigma–Aldrich) were added, and cells were then incubated for a total of 6 h. Cells were washed with FACS buffer, stained for viability and cell surface antigens, then permeabilized using BD Cytfix/Cytoperm solution (BD Bioscience). Cells were then stained with anti-IFN- γ and -TNF- α antibodies for 30 min, washed twice in BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and fixed in FACS fix buffer (1 \times PBS, 1% formaldehyde). For analysis, cells were gated on viable CD3⁻CD56⁺/CD16⁺ (Figure 2A).

Phenotypic analysis of NK cells and DCs by flow cytometry.

Purity and activation of NK cells and DCs was evaluated by surface staining NK cells with anti-CD3, -CD16, -CD56, and -CD69 antibodies, and DCs with anti-CD11c, -CD14, -CD83, -HLA-DR, -IL-15 and -IL-15R α . Cells were then fixed in FACS Fix buffer.

Cytokine detection by ELISA.

iDCs were either matured with LPS or ssRNA for 6 h. Cells were washed and further incubated for 16 h. IL-12p70 secretion by DCs was measured in culture supernatant by ELISA (Human IL-12p70 ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience).

Statistical analysis.

Comparisons between acute HCV, HCV spontaneous resolution, HCV chronic evolution, HCV-IDUs and healthy donors were evaluated by 1-way ANOVA. Data were analyzed with GraphPad Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

NK cell-mediated killing of immature DCs is intact during HCV infection

Chronic evolution of HCV infection is associated with failure to prime or sustain a robust HCV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell response (39). However, it is currently unknown if it is caused by direct exhaustion of virus-specific T cells by persistent viral replication or poor DC-priming of efficient T cell responses. It is possible that the presence of tolerogenic DCs could induce tolerant T cell responses. NK cells have emerged as regulators of DCs by eliminating immature DCs thus preventing the development of tolerant responses. To test whether defects in NK/DC cross-talk occur during HCV infection, we performed a cross-sectional study examining NK cell-mediated killing of DCs during acute HCV infection (n = 7), after spontaneous resolution (n = 10) and during chronic HCV infection (n = 10). Acute infection was studied 2 months after estimated time of infection (range from 2 weeks to 17 weeks), while spontaneous resolution and chronic evolution were studied more than 2 years after acute HCV infection. HCV negative intravenous drug users (HCV- IDUs) (n = 10) and healthy donors (n = 10) served as negative controls. Patients' demographics and characteristics are shown in Table 1. First, we examined the cross-talk between resting NK (rNK) cells, activated NK (aNK) cells and immature monocyte-derived DCs (iDCs) *in vitro*. NK cells were isolated from fresh blood of different patients and cultured with either sub-optimal or high doses of IL-2 to generate rNK cells and aNK cells, respectively. The activation status of NK cells was confirmed by evaluating CD69 expression. We observed no difference in the activation status of NK cells from the different patient groups in response to culture with IL-2 (Figure 1A). In parallel, monocyte-derived DCs (MDDCs) were generated from the peripheral blood of the same patients as described in Materials and Methods. Immature MDDCs (iDCs) were then matured with either LPS or ssRNA to generate mature DCs (mDCs). No differences were observed in the maturation status of iDCs and LPS-matured mDCs derived from the different patients and control groups as defined by HLA-DR^{high}CD83⁺ expression (Figure 1B).

To evaluate the capacity of NK cells to kill and eliminate DCs, we co-cultured rNK cells and aNK cells with iDCs or mDCs. Viable DCs were determined as FSC^{high}SSC^{high}HLA-DR⁺AnnexinV⁻7-AAD⁻ (Figure 1C). NK cells were excluded based on their FSC^{low}SSC^{low} properties. DC viability was expressed as the difference between percent of viable DCs at the end of DC co-culture with NK cells and

DCs alone. As previously shown, aNK cells induced more killing of iDCs than rNK cells (Figure 1D-E) and iDCs were more sensitive to aNK cell-mediated killing than mDCs (Figure 1E-F) but no significant differences were observed among the different patient groups or in comparison to healthy controls (Figure 1D-F). These results suggest that NK cells are able to mediate killing of iDCs during different stages of HCV infection.

Differential regulation of rNK cells by mDCs and iDCs

NK cells and DCs undergo a cognate interaction where NK cells regulate DC function and DCs activate NK cells. iDCs, LPS-matured DCs (mDC LPS) or ssRNA-matured DCs (mDC ssRNA) were co-cultured with rNK cells. DC capacity to activate rNK cells or to potentiate rNK cell cytotoxicity against K562 target cells was evaluated by measuring IFN- γ and TNF- α production, and CD107a degranulation respectively, by flow cytometry. NK cells were defined as CD3⁻CD56⁺/CD16⁺. Representative Flow cytometry data is presented in Figure 2A. Cumulative data from all subjects tested are presented in Figure 2B-F. As previously reported (14, 16), mDCs were able to induce cytokine production by rNK cells in all patients and controls (n = 47) (Figure 2B and 2D). Co-culture of LPS-matured DCs or ssRNA-matured DCs with rNK cells induced IFN- γ production by rNK cells in absence of any NK cell targets (Figure 2B) but only ssRNA-matured DCs induced statistically significant TNF- α production (Figure 2D). Furthermore, ssRNA-matured DC induction of TNF- α by rNK cells was significantly higher than LPS-matured DCs. In addition to directly activating rNK cells, both LPS-matured DCs and ssRNA-matured DCs potentiated rNK cell cytotoxicity towards K562 target cells by inducing CD107a up-regulation, as well as IFN- γ and TNF- α production (Figure 2C-F).

Unlike mature DCs, immature DCs inhibited NK cell function. Co-cultures of iDCs and rNK cells inhibited spontaneous TNF- α production by rNK cells (Figure 2D). In addition, iDCs co-cultured with rNK cells inhibited CD107a up-regulation and IFN- γ production by rNK cells in response to K562 cells (Figure 2C and 2F). Next we examined if there were any differences in iDC-induced inhibition of rNK cells at the different stages of HCV infection, as compared to HCV- IDUs and healthy donor controls. HCV patients were stratified by their infection status. We observed that iDC-mediated inhibition of rNK cell IFN- γ production was similar between acute HCV, spontaneous resolution, chronic evolution and HCV negative controls (Figure 3A). Similarly, we observed no differences in the

rNK cell response to K562 between HCV-infected individuals and controls (Figures 3B, 3D and 3E). However, we observed less inhibition of spontaneous TNF- α production during iDC co-culture with rNK cells from chronic HCV patients as compared to acute patients (Figure 3C). Although statistically significant, this inhibition was minimal within a 1% variation. In summary, as previously described, mature DCs activated rNK cells but this is the first demonstration of immature DC-induced inhibition of NK cell function.

Mature DC-induced activation of NK cell function is intact during HCV infection.

We have demonstrated that mature DCs activate rNK cells (Figure 2). We then examined if there were any differences between different stages of HCV infection and controls. We did not observe any differences in rNK cell spontaneous TNF- α production after co-culture with mDC LPS or mDC ssRNA between patient groups and controls (data not shown and Figure 4C). Similarly, we did not observe any differences in rNK cell IFN- γ and TNF- α production or CD107a degranulation in response to K562 cells after co-culture with mDC LPS or mDC ssRNA (data not shown and Figures 4B, 4D and 4E). We observed lower mDC ssRNA-induced IFN- γ production by rNK cells in HCV- IDUs in comparison to healthy donors (Figure 4A). However, if we removed the outlier in the healthy donors group from the analysis, the results were no longer statistically significant.

Next, we evaluated the polyfunctionality or combined functions of NK cells which may reflect a higher activation status (6). We analyzed the frequency of NK cells exhibiting one or more function including degranulation and production of IFN- γ and TNF- α using the Spice software (40). We observed that in co-culture with mDC ssRNA the frequency of CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻ rNK cells was reduced in acutes, resolvers, chronics and HCV- IDUs in comparison to healthy donors (Figure 4F). In order to further determine the mechanisms responsible for the reduced mDC-mediated activation of IFN- γ mono-producing rNK cells, we measured the capacity of rNK cells to respond to exogenous IL-15 and IL-12 (data not shown), we measured IL-12 secretion by mDC ssRNA (data not shown), as well as mDC ssRNA surface expression of IL-15 and IL-15R α which suggests IL-15 trans presentation by IL-15R α (Figure 4G). We observed a modest positive correlation between the frequency of single positive (CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) rNK cells activated by mDC ssRNA and the frequency of IL-15⁺IL-15R α ⁺ mDC ssRNA (Figure 4H).

Our results suggest that mDCs activate rNK cells as they induce rNK cell cytokine production and potentiate degranulation against target cells. We also observed reduced frequency of IFN- γ mono-functional rNK cells in response to activation by mDC ssRNA in all HCV-infected groups and in uninfected IDUs in comparison to healthy donors, and this correlated positively with frequency of IL-15⁺IL-15R α ⁺ mDC ssRNA. The frequency of these rNK cells (CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) accounts for a small fraction of total NK cells, and the reduced frequency of this fraction was not accompanied by an increase in the triple- (CD107a⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺) or double-positive fraction (CD107a⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁻ or CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁺). Therefore, its affect on the total NK cell response might be minor or irrelevant.

Reciprocal NK-DC cross-talk is intact during HCV infection.

We have demonstrated in the previous section (Figure 2 and 4) that mature DCs activate rNK cells. We next evaluated if rNK cells activated by DCs from HCV-infected individuals were able to reciprocally kill DCs, as previously described (16). The purpose of these experiments was to evaluate rNK cell function after direct activation by DCs rather than by exogenous cytokines (ex: IL-2 used in Figure 1) which might not accurately reflect rNK cell activation *in vivo*. As described above, we co-cultured iDCs, mDC LPS or mDC ssRNA with rNK cells. We measured CD107a degranulation by rNK cells in absence of any other NK cell target to evaluate if rNK cells activated by DCs can reciprocally kill autologous DCs during this interaction. We observed that iDCs did not induce CD107a degranulation by rNK cells but rather inhibited spontaneous degranulation (Figure 5A). We did not observe any differences between HCV-infected patients and controls in the level of iDC-induced CD107a degranulation (Figure 5B). These observations are consistent with our results showing that iDCs inhibit NK cell function (Figure 2) so it is not surprising that rNK cells do not reciprocally kill iDCs. We have shown in Figure 4 that co-culture of mDC LPS and mDC ssRNA with rNK cells induced cytokine production by rNK cells and degranulation against target cells. Here, we observed that in the absence of target cells, co-culture of mDC LPS and mDC ssRNA with rNK cells induced CD107a degranulation by rNK cells suggesting that they have become activated and may kill autologous mDCs (Figure 5A). However, we did not observe any differences between HCV-infected patients and controls (Figures 5C and 5D). These results are in line with our previous findings demonstrating that IL-2-

activated NK cells can kill both iDCs and mDCs although to a lesser extent (Figure 1), and that there are no defects in this process during different stages of HCV infection.

Discussion

In this study we have analyzed for the first time the NK/DC cross-talk during acute and chronic HCV as well as after HCV spontaneous resolution. We observed that NK cell-mediated killing of DCs is intact during HCV infection. We also demonstrated for the first time that immature DCs inhibited rNK cell cytokine production and cytotoxicity against tumor cell lines and autologous immature DCs. Furthermore, we observed that LPS- and ssRNA-matured DCs induced rNK cell cytokine production and cytotoxicity against tumor cell lines and autologous mature DCs. Further analysis demonstrated that the frequency of rNK cells producing only IFN- γ (CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) in co-culture with mDC ssRNA was lower in all HCV-infected patients and un-infected IDUs as compared to healthy donors. These IFN- γ mono-producing NK cells account for a small fraction of NK cells so their affect on the total NK cell response might be minor. Globally, our results suggest that the NK/DC cross-talk is intact during HCV infection.

We have observed that activated NK cells and to a lesser extent resting NK cells are able to kill iDCs but mDCs were more resistant to NK cell-mediated killing. There were no differences between HCV-infected patients and controls in the level of NK cell-mediated killing of iDCs and mDCs. This is in agreement with results from our group and others demonstrating that NK cells from acute and chronic HCV-infected patients are not defective in their cytotoxic capacity (1, 30, 35, 36). Furthermore, our data suggest that NK cell-mediated killing of iDCs prevents the accumulation of immature and tolerogenic DCs in lymph nodes and consequently prevents the development of tolerogenic HCV-specific T cell responses. This hypothesis is further supported by our recent study examining *ex-vivo* DCs during acute HCV (manuscript in revision). In this study, we have demonstrated that numbers, maturation status and function of myeloid DCs are not reduced during acute HCV infection with chronic evolution, and that myeloid DCs even exhibit hyperresponsiveness during acute resolving HCV and that there is no appearance of tolerogenic DCs. However, DCs derived from peripheral blood monocytes might not reflect DCs in lymph nodes, where NK/DC cross-talk is thought to occur. Indeed, it has been shown during HIV infection that in contrast to peripheral blood DCs, DCs from lymph nodes had a partial immature phenotype expressing higher MHC molecules but lower co-stimulatory molecules. This phenotype was reproduced *in vitro* by treating DCs with exogenous IL-10 or by infecting DCs with HIV.

Both treatments rendered iDCs more resistant and mDCs more sensitive to NK cell-mediated killing thus potentially favoring the accumulation of tolerogenic DCs in lymph nodes (3). Increased serum levels of IL-10 are observed during both acute HIV and acute HCV (44). Therefore it is possible that NK-mediated killing of DCs is different for DCs in lymph nodes, DCs that have been in contact with HCV or liver resident DCs. In future studies, it will be interesting to examine if DCs that have taken up apoptotic HCV-infected hepatocytes are more or less sensitive to NK cell-mediated killing. Increased killing of these DCs for example could consequently reduce tolerogenic DCs but also the number of DCs presenting HCV antigens thus priming of T cells.

We have demonstrated for the first time that immature DCs inhibit rNK cell cytokine production and CD107a degranulation against tumor cell lines. After being inhibited by iDCs, these rNK cells were not able to reciprocally kill autologous immature DCs (Figure 5). This phenomenon is perhaps a control mechanism where iDCs keep NK cells in check. On one hand, in the absence of infection, iDCs would prevent NK cell activation in peripheral tissues in order to prevent immuno-pathology. This would imply that only in the presence of infection do immature DCs recognize pathogens, acquire a mature phenotype and activate resting NK cells so that the later can help control the infection in inflamed tissues. On the other hand, it is possible that in the presence of an infection, iDCs inhibit NK cell function after viral clearance in order to limit immuno-pathology. This hypothesis is consistent with some of our recent data on *ex-vivo* DCs (manuscript in revision). In this study we have observed that pDCs during acute resolving HCV have a more immature phenotype as compared to acute HCV with chronic evolution and non infected controls. Therefore, this immature pDC phenotype during acute resolving HCV could inhibit NK cell function. Several mechanisms might contribute to iDC-mediated inhibition of rNK cells. These could include contact dependent or independent mechanisms. Contact-dependent mechanisms could be mediated by iDC expression of ligands for NK cell inhibitory receptors or lack of expression of ligands for NK cell activating receptors. On the other hand, since mDC activation of rNK cells is dependent on cytokines such as IL-15, IL-12 and type I IFN, it is possible that iDC inhibition of rNK cells is also dependent on cytokines. IL-10 has been reported to induce tolerogenic DCs and to alter the expression of certain ligands for NK cell receptors such as MHC molecules that bind to KIRs and MICA/B that bind to NKG2D (3). Since, IL-10 is also secreted by DCs, it is possible that IL-10 acts directly on NK cells. Furthermore, TGF- β has also been shown to

inhibit NK cell IFN- γ secretion (25) and NK cell maturation during mouse infancy (27). Of interest, TGF- β also inhibits DC-mediated activation of rNK cell secretion of IFN- γ in response to malaria-infected red blood cells (32). However, none of these studies have directly shown that DCs produce TGF- β , but other reports have demonstrated that particular DC subsets can produce TGF- β especially in the gut mucosa (10). Overall, we have demonstrated that iDCs inhibit rNK cell function but the underlying mechanisms will require further investigation.

To study the capacity of mature DCs to activate rNK cells, we have matured DCs with LPS or ssRNA. LPS was used as a control while ssRNA was used to mimic HCV. As expected, we observed no difference between HCV-infected patients and controls in regards to LPS-matured DCs induction of rNK cell cytokine production and cytotoxicity against a tumor cell line or autologous mature DCs. Our results are in accordance with a previous study demonstrating that LPS-matured DCs induce rNK cell cytokine production and cytotoxicity during chronic HCV as compared to uninfected controls (23). However, in that study IFN- α -matured DCs could not activate rNK cells because of failure to up-regulate the NKG2D ligands, MICA/B. Our findings are also in line with another study examining the capacity of pDCs to activate rNK cells, after being matured with unmethylated CpG which mimics DNA viruses (9). This study reported that only pDCs from HIV-infected individuals but not HCV-infected individuals failed to induce rNK cell cytokine secretion, granzyme B production and cytotoxicity as compared to uninfected controls.

In addition to using LPS, we also matured DCs with ssRNA to mimic HCV and to examine if DCs responded more or less to *in vitro* ssRNA after being pre-exposed to HCV *in vivo*. Our results suggest no overall defects in the capacity of ssRNA-matured DCs to activate rNK cells, but we have observed a minor defect. We have demonstrated decreased capacity of ssRNA-matured DCs to induce IFN- γ production by rNK cells from patients with all HCV-infected patients and uninfected IDUs as compared to healthy donors. This defect was limited to rNK cells producing only IFN- γ (CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) which represents less than 3% of total rNK cells. The frequency of these IFN- γ mono-producing cells positively correlated with the frequency of IL-15⁺IL-15R α ⁺ mDC ssRNA. It is known that DC trans-presentation of IL-15 by IL-15R α is crucial for promoting NK cell survival and proliferation (7, 31), but our results suggest it might be involved in the induction of IFN- γ production by

NK cells as well. Interestingly, intact degranulation but decreased IFN- γ production by NK cells has been previously described by us and others during acute and chronic HCV (1, 35, 36). However, low IFN- γ secretion was also observed in aviremic spontaneous resolvers and uninfected IDUs so HCV viral replication is probably not the only cause. A possible explanation for low mDC induction of IFN- γ production by NK cells is opioid abuse. Indeed, most of the HCV-infected subjects included in this study are active heroin users and previous studies have reported that heroin abuse can reduce NK cell activity (34, 47). *In vivo* and *in vitro* studies have demonstrated in humans, non-human primates and rodents, that morphine and its derivatives can interact with their receptor expressed by several immune cells including NK cells to suppress NK cell activity (15, 46, 48). It is however possible that other factors may influence the failure of mDCs to induce IFN- γ production by rNK cells. Furthermore, the impact of the reduced frequency of IFN- γ mono-producing rNK cells (CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) which account for a minority of total rNK cells will require further investigation.

In conclusion, we have analyzed for the first time the NK/DC cross-talk during acute and chronic HCV, as well as after HCV spontaneous resolution. We have demonstrated that both NK cell-mediated killing of iDCs, as well as mDC-mediated activation of rNK cells is intact during different stages of HCV infection. Furthermore, we have demonstrated for the first time that immature DCs inhibit rNK cell function in all HCV-infected patients and uninfected subjects. Because priming of HCV-specific T cell responses occurs during acute HCV, follow-up of acute HCV patients to determine if they will eventually resolve spontaneously or become chronically infected will be crucial to determine if there are differences between the two infectious outcomes. We propose that the NK/DC cross-talk is intact during HCV infection and that other mechanisms are probably responsible for the failure to sustain HCV-specific T cell responses during chronic HCV.

Table and figures

Table I^{m3}: Demographics and Characteristics of patients and donors.

	n	Gender (M/F)	Age (median yr)	Genotype (1/3/4/5/NA)
Acute HCV	7	5/2	27	3/2/0/0/2
HCV spontaneous resolution	10	10/0	46	1/1/0/0/8*
HCV chronic evolution	10	5/5	49	6/0/1/1/2
HCV negative IDUs	10	7/3	34	
Healthy donors	10	6/4	28	

N/A: not available

*Most spontaneous resolvers were already HCV RNA- at recruitment so HCV genotyping was not possible

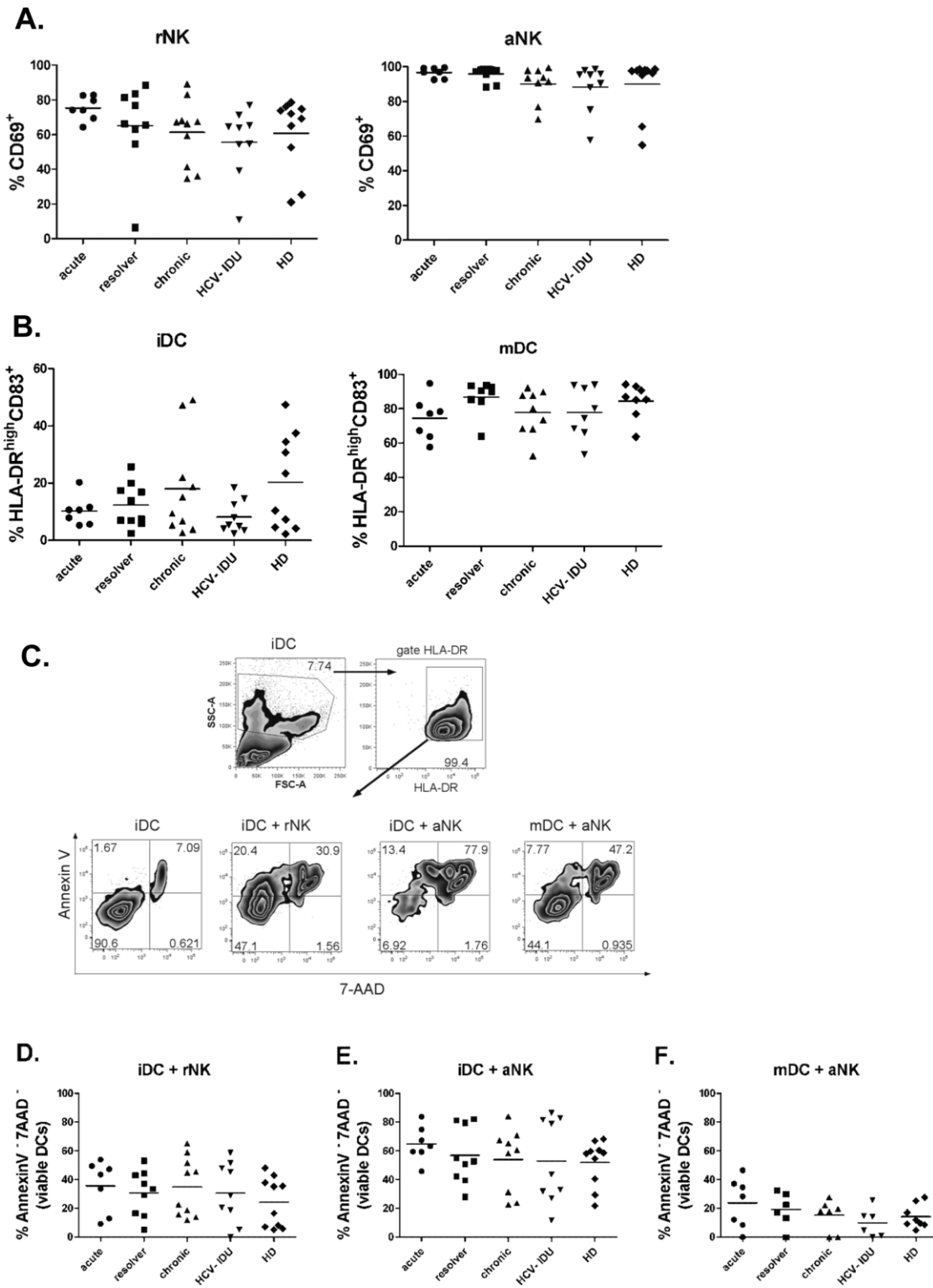


Figure 1^{m3} : NK cell-mediated killing of DCs is intact during different stages of HCV infection.

(A) Activation status of resting NK (rNK) cells (left panel) and IL-2 activated NK (aNK) cells (right panel) isolated from the peripheral blood of different patient groups, measured as frequency of CD69⁺ cells. (B) Maturation status of monocyte-derived DCs derived from the peripheral blood of different patient groups, measured as the frequency of HLA-DR^{high}CD83⁺ iDCs (left panel) and mDCs matured with LPS (right panel). (C-F) rNK cells or aNK cells were co-cultured with iDCs or mDCs LPS for 24h to evaluate the capacity of NK cells to kill DCs. (C) Strategy for gating on viable DCs: FSC^{high}SSC^{high}HLA-DR⁺AnnexinV⁻7-AAD⁻. NK cells were excluded based on their FSC^{low}SSC^{low} profile. (D-F) DC viability defined as the difference [% AnnexinV⁻7-AAD⁻ iDCs (in co-culture with NK cells)] - [% AnnexinV⁻7-AAD⁻ iDCs (cultured alone)]. (D) iDCs in co-culture with rNK cells, (E) iDCs in co-culture with aNK cells, (F) mDCs in co-culture with aNK cells. Mean is represented by a horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. One-way ANOVA.

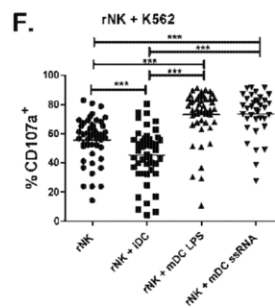
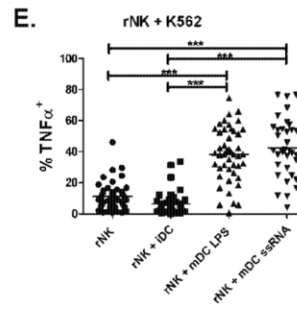
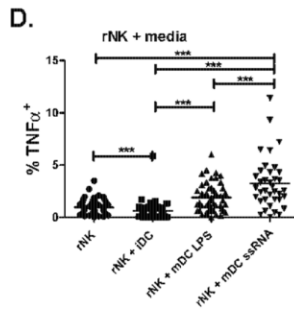
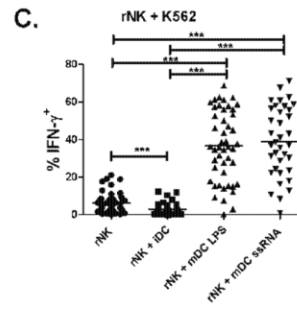
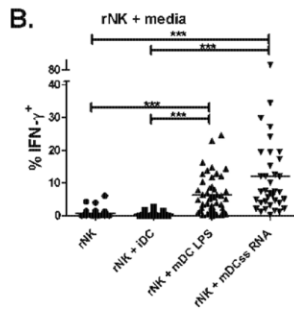
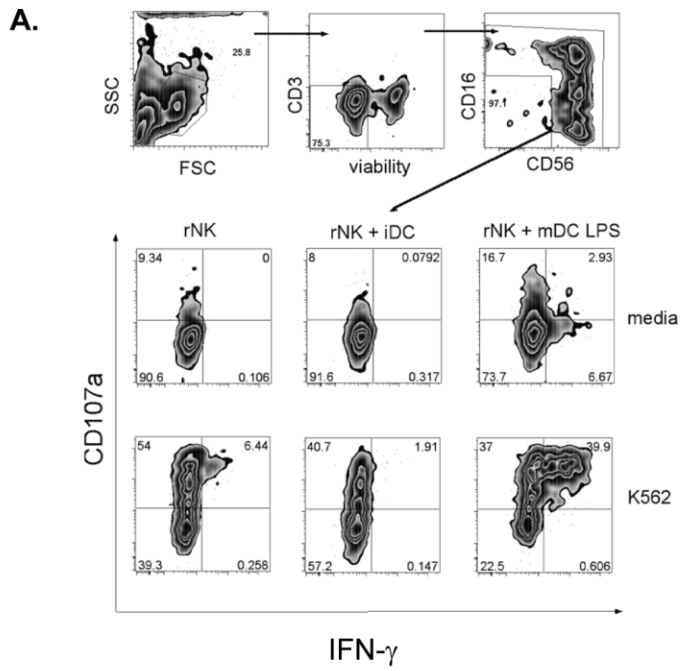
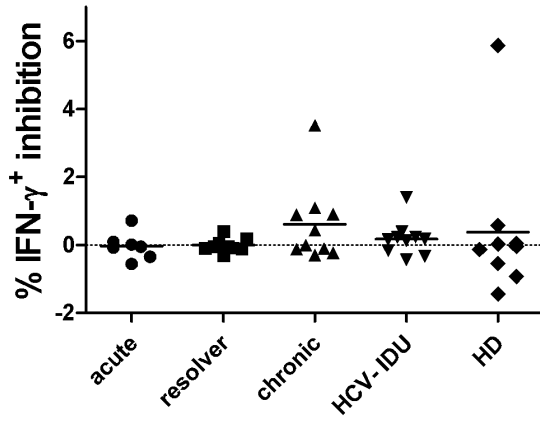


Figure 2^{m3} : Differential regulation of rNK cells by mDCs and iDCs.

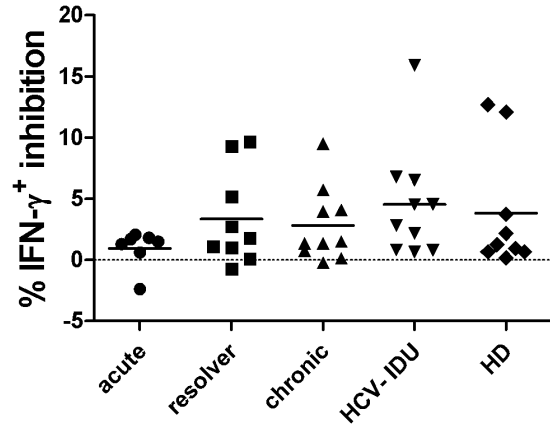
rNK cells were co-cultured with iDCs, mDCs LPS or mDCs ssRNA for 16h and for an additional 6h in the absence or presence of target cells to evaluate the capacity of DCs to activate rNK cells. (A) Strategy for gating on rNK cells (top row) and representative dot plot for functional characterization of DC-mediated activation of rNK cells (middle row) and activation of rNK cell response against K562 target cells (bottom row). (B-F) Co-cultures of DCs and rNK cells from all HCV-infected and uninfected donors. (B) Frequency of rNK cells producing IFN- γ , (C) IFN- γ in response to K562, (D) TNF- α , (E) TNF- α in response to K562 and (F) CD107a in response to K562. Mean is represented by a horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. One-way ANOVA.

A.

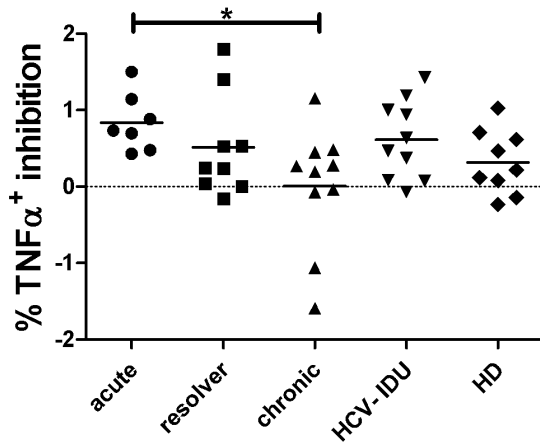
rNK + iDC + media

**B.**

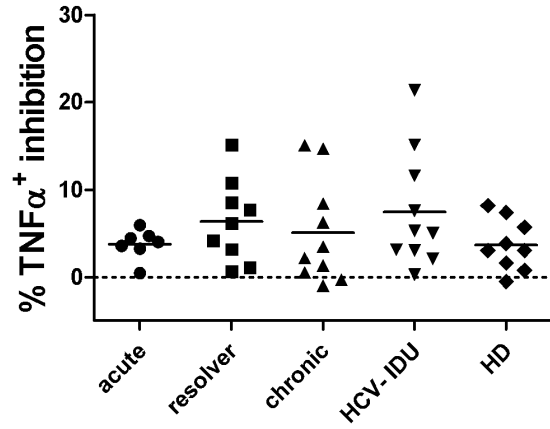
rNK + iDC + K562

**C.**

rNK + iDC + media

**D.**

rNK + iDC + K562

**E.**

rNK + iDC + K562

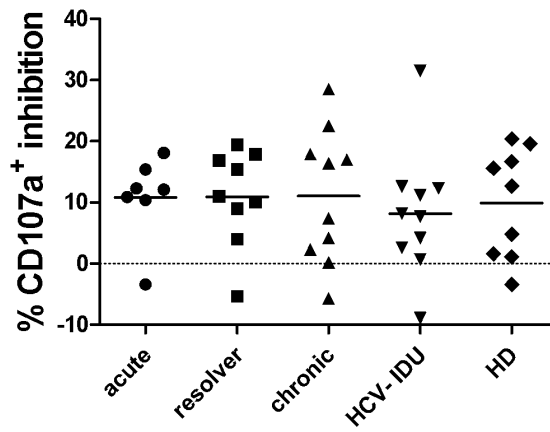


Figure 3^{m3} : Immature DC-induced inhibition of NK cell function is intact during HCV infection.

rNK cells were co-cultured with iDCs for 16h and for an additional 6h in the absence or presence of target cells in order to evaluate the capacity of iDCs to inhibit rNK cells during different stages of HCV infection. (A) Frequency of rNK cells producing IFN- γ , (B) IFN- γ in response to K562, (C) TNF- α , (D) TNF- α in response to K562 and (E) CD107a in response to K562 in patients with acute HCV, HCV spontaneous resolution, chronic HCV, uninfected IDUs and healthy donors. Results are expressed as % inhibition (rNK cells only - rNK cells in co-culture with DCs). Mean is represented by a horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. One-way ANOVA.

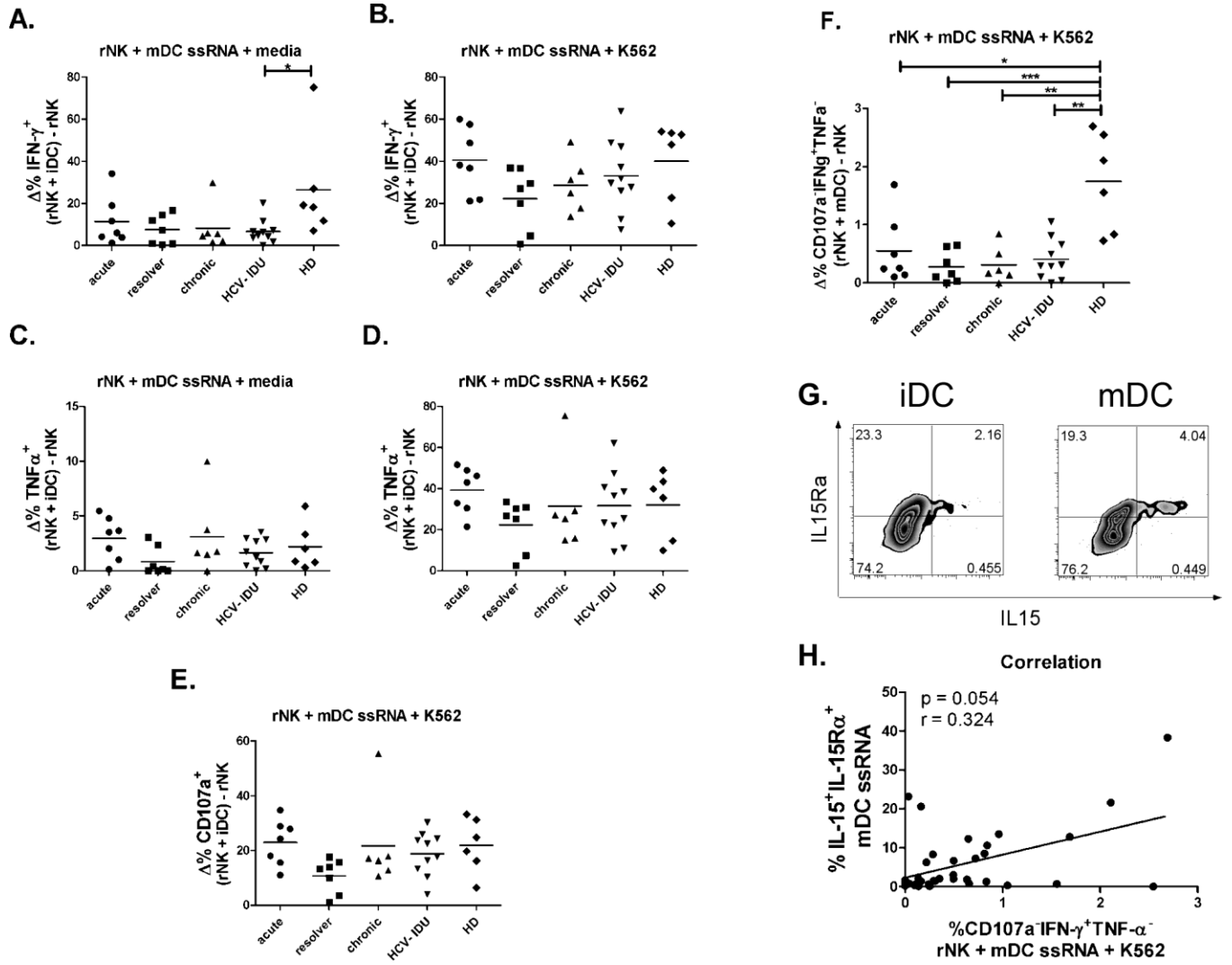


Figure 4^{m3} : Mature DC-induced activation of NK cell function is intact during HCV infection.

rNK cells were co-cultured with mDCs ssRNA for 16h and for an additional 6h in the absence or presence of target cells to evaluate the capacity of mDCs to activate rNK cells. (A) Frequency of IFN- γ ⁺ rNK cells co-cultured with ssRNA-matured DCs and (B) in response to K562, (C) frequency of TNF- α ⁺ rNK cells co-cultured with ssRNA-matured DCs and (D) in response to K562, (E) frequency of CD107a⁺ rNK cells co-cultured with ssRNA-matured DCs in response to K562, (F) frequency of CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻ rNK cells co-cultured with ssRNA-matured DCs in response to K562 in patients with acute HCV, HCV spontaneous resolution, chronic HCV, uninfected IDUs and healthy donors. Results are expressed as $\Delta\%$ (rNK cells in co-culture with DCs – rNK cells only). Mean is represented by a horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. One-way ANOVA. (G) Representative dot plot of surface IL-15 and IL-15R α expression by iDCs (left panel) and mDCs (right panel). (H) Spearman correlation between frequency of IL-15⁺IL-15R α ⁺ ssRNA-matured DCs and frequency of CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻ rNK cells co-cultured with ssRNA-matured DCs in response to K562.

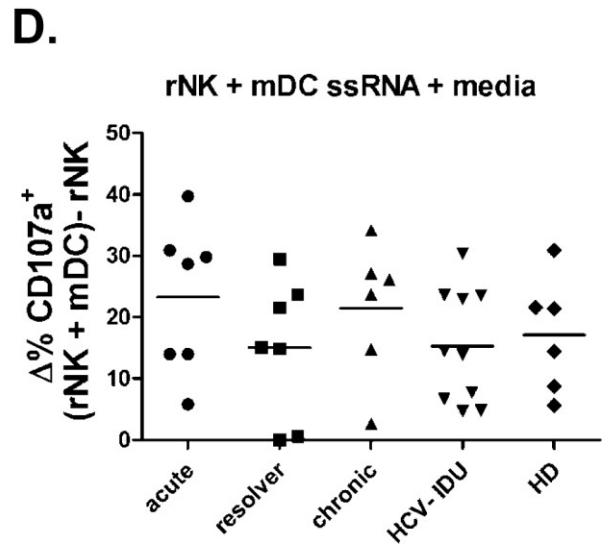
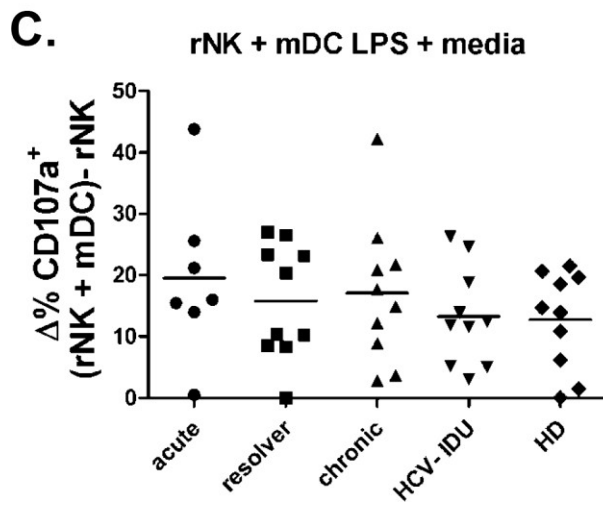
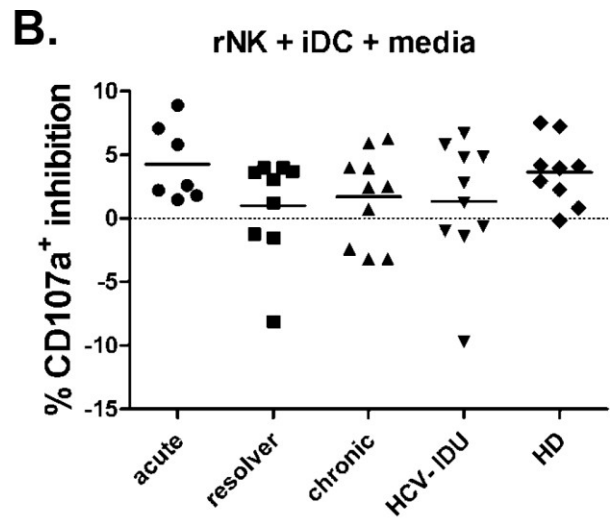
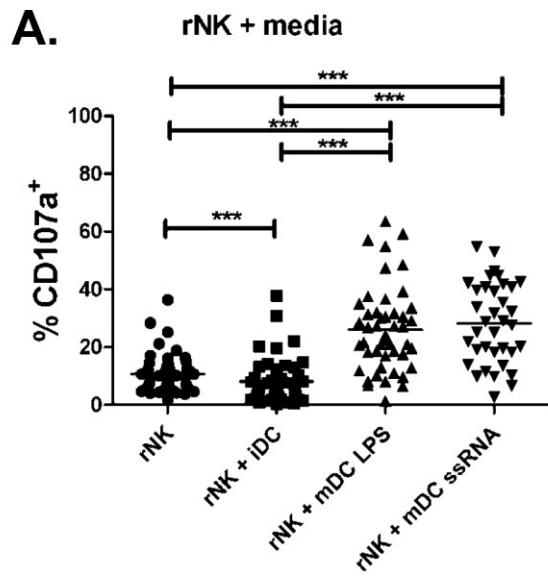


Figure 5^{m3} : Reciprocal NK/DC cross-talk is intact during HCV infection.

rNK cells were co-cultured with iDCs, mDCs LPS or mDCs ssRNA for 22h in the absence of any other target cells. The capacity of rNK cells to reciprocally kill autologous DCs during this interaction was evaluated by rNK cell degranulation. (A) Frequency of CD107a⁺ rNK cells in co-culture with DCs from all HCV-infected and un-infected donors. (B) % inhibition of CD107a⁺ rNK cells in co-culture with iDCs, (C) frequency of CD107a⁺ rNK cells in co-culture with mDC LPS and (D) with mDC ssRNA in patients with acute HCV, HCV spontaneous resolution, chronic HCV, uninfected IDUs and healthy donors. Results are expressed as (B) % inhibition (rNK cells only - rNK cells in co-culture with DCs) or (C-D) $\Delta\%$ (rNK cells in co-culture with DCs - rNK cells only). Mean is represented by a horizontal bar. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001. One-way ANOVA.

References

1. **Ahlenstiel, G., R. H. Titerence, C. Koh, B. Edlich, J. J. Feld, Y. Rotman, M. G. Ghany, J. H. Hoofnagle, T. J. Liang, T. Heller, and B. Rehermann.** 2010. Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology* **138**:325-335 e321-322.
2. **Alter, G., S. Jost, S. Rihn, L. L. Reyor, B. E. Nolan, M. Ghebremichael, R. Bosch, M. Altfeld, and G. M. Lauer.** 2011. Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol* **55**:278-288.
3. **Alter, G., D. Kavanagh, S. Rihn, R. Luteijn, D. Brooks, M. Oldstone, J. van Lunzen, and M. Altfeld.** 2010. IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *J Clin Invest* **120**:1905-1913.
4. **Amadei, B., S. Urbani, A. Cazaly, P. Fisicaro, A. Zerbini, P. Ahmed, G. Missale, C. Ferrari, and S. I. Khakoo.** 2010. Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138**:1536-1545.
5. **Borg, C., A. Jalil, D. Laderach, K. Maruyama, H. Wakasugi, S. Charrier, B. Ryffel, A. Cambi, C. Figdor, W. Vainchenker, A. Galy, A. Caignard, and L. Zitvogel.** 2004. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* **104**:3267-3275.
6. **Boulet, S., R. Song, P. Kanya, J. Bruneau, N. H. Shoukry, C. M. Tsoukas, and N. F. Bernard.** 2010. HIV protective KIR3DL1 and HLA-B genotypes influence NK cell function following stimulation with HLA-devoid cells. *J Immunol* **184**:2057-2064.
7. **Brilot, F., T. Strowig, S. M. Roberts, F. Arrey, and C. Munz.** 2007. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15 α . *J Clin Invest* **117**:3316-3329.
8. **Cheent, K., and S. I. Khakoo.** 2011. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* **60**:268-278.
9. **Conry, S. J., K. A. Milkovich, N. L. Yonkers, B. Rodriguez, H. B. Bernstein, R. Asaad, F. P. Heinzl, M. Tary-Lehmann, M. M. Lederman, and D. D. Anthony.** 2009. Impaired plasmacytoid dendritic cell (PDC)-NK cell activity in viremic human immunodeficiency virus infection attributable to impairments in both PDC and NK cell function. *J Virol* **83**:11175-11187.
10. **Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie.** 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**:1757-1764.
11. **Dolganiuc, A., and G. Szabo.** 2011. Dendritic cells in hepatitis C infection: can they (help) win the battle? *J Gastroenterol* **46**:432-447.
12. **Draghi, M., A. Pashine, B. Sanjanwala, K. Gendzekhadze, C. Cantoni, D. Cosman, A. Moretta, N. M. Valiante, and P. Parham.** 2007. NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol* **178**:2688-2698.
13. **Ferlazzo, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta, and C. Munz.** 2004. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural

- killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16606-16611.
14. **Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Munz.** 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* **195**:343-351.
 15. **Friedman, H., C. Newton, and T. W. Klein.** 2003. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse. *Clinical microbiology reviews* **16**:209-219.
 16. **Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri.** 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* **195**:327-333.
 17. **Gerosa, F., A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra, and G. Trinchieri.** 2005. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* **174**:727-734.
 18. **Golden-Mason, L., A. L. Cox, J. A. Randall, L. Cheng, and H. R. Rosen.** 2010. Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology* **52**:1581-1589.
 19. **Hayakawa, Y., V. Screpanti, H. Yagita, A. Grandien, H. G. Ljunggren, M. J. Smyth, and B. J. Chambers.** 2004. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* **172**:123-129.
 20. **Hoofnagle, J. H.** 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* **36**:S21-29.
 21. **Huntington, N. D., H. Puthalakath, P. Gunn, E. Naik, E. M. Michalak, M. J. Smyth, H. Tabarias, M. A. Degli-Esposti, G. Dewson, S. N. Willis, N. Motoyama, D. C. Huang, S. L. Nutt, D. M. Tarlinton, and A. Strasser.** 2007. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol* **8**:856-863.
 22. **Ing, R., and M. M. Stevenson.** 2009. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. *Infection and immunity* **77**:770-782.
 23. **Jinushi, M., T. Takehara, T. Kanto, T. Tatsumi, V. Groh, T. Spies, T. Miyagi, T. Suzuki, Y. Sasaki, and N. Hayashi.** 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* **170**:1249-1256.
 24. **Laffont, S., C. Seillet, J. Ortaldo, J. D. Coudert, and J. C. Guery.** 2008. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood* **112**:661-671.
 25. **Laouar, Y., F. S. Sutterwala, L. Gorelik, and R. A. Flavell.** 2005. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* **6**:600-607.
 26. **Mandaric, S., S. M. Walton, T. Rulicke, K. Richter, M. J. Girard-Madoux, B. E. Clausen, A. Zurunic, M. Kamanaka, R. A. Flavell, S. Jonjic, and A. Oxenius.** 2012. IL-10 Suppression of NK/DC Crosstalk Leads to Poor Priming of MCMV-Specific CD4 T Cells and Prolonged MCMV Persistence. *PLoS Pathog* **8**:e1002846.
 27. **Marcoe, J. P., J. R. Lim, K. L. Schaubert, N. Fodil-Cornu, M. Matka, A. L. McCubbrey, A. R. Farr, S. M. Vidal, and Y. Laouar.** 2012. TGF-beta is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat Immunol*.

28. **Mavilio, D., G. Lombardo, A. Kinter, M. Fogli, A. La Sala, S. Ortolano, A. Farschi, D. Follmann, R. Gregg, C. Kovacs, E. Marcenaro, D. Pende, A. Moretta, and A. S. Fauci.** 2006. Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *J Exp Med* **203**:2339-2350.
29. **Melki, M. T., H. Saidi, A. Dufour, J. C. Olivo-Marin, and M. L. Gougeon.** 2010. Escape of HIV-1-infected dendritic cells from TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity during NK-DC cross-talk--a pivotal role of HMGB1. *PLoS Pathog* **6**:e1000862.
30. **Morishima, C., D. M. Paschal, C. C. Wang, C. S. Yoshihara, B. L. Wood, A. E. Yeo, S. S. Emerson, M. C. Shuhart, and D. R. Gretch.** 2006. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* **43**:573-580.
31. **Munz, C., T. Dao, G. Ferlazzo, M. A. de Cos, K. Goodman, and J. W. Young.** 2005. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood* **105**:266-273.
32. **Newman, K. C., D. S. Korbel, J. C. Hafalla, and E. M. Riley.** 2006. Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer cell interferon-gamma responses to malaria. *PLoS Pathog* **2**:e118.
33. **Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, M. Y. Dalod, J. B. Van Deusen, X. Q. Wei, F. Y. Liew, M. A. Caligiuri, J. E. Durbin, and C. A. Biron.** 2002. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* **169**:4279-4287.
34. **Novick, D. M., M. Ochshorn, V. Ghali, T. S. Croxson, W. D. Mercer, N. Chiorazzi, and M. J. Kreek.** 1989. Natural killer cell activity and lymphocyte subsets in parenteral heroin abusers and long-term methadone maintenance patients. *J Pharmacol Exp Ther* **250**:606-610.
35. **Oliviero, B., S. Varchetta, E. Paudice, G. Michelone, M. Zaramella, D. Mavilio, F. De Filippi, S. Bruno, and M. U. Mondelli.** 2009. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* **137**:1151-1160, 1160 e1151-1157.
36. **Pelletier, S., C. Drouin, N. Bedard, S. I. Khakoo, J. Bruneau, and N. H. Shoukry.** 2010. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J Hepatol* **53**:805-816.
37. **Pende, D., R. Castriconi, P. Romagnani, G. M. Spaggiari, S. Marcenaro, A. Dondero, E. Lazzeri, L. Lasagni, S. Martini, P. Rivera, A. Capobianco, L. Moretta, A. Moretta, and C. Bottino.** 2006. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* **107**:2030-2036.
38. **Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri, and N. M. Valiante.** 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* **195**:335-341.
39. **Rehermann, B.** 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* **119**:1745-1754.
40. **Roederer, M., J. L. Nozzi, and M. C. Nason.** 2011. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **79**:167-174.
41. **Sanabria, M. X., D. A. Vargas-Inchaustegui, L. Xin, and L. Soong.** 2008. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. *Infection and immunity* **76**:5100-5109.

42. **Semino, C., G. Angelini, A. Poggi, and A. Rubartelli.** 2005. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* **106**:609-616.
43. **Spaggiari, G. M., R. Carosio, D. Pende, S. Marcenaro, P. Rivera, M. R. Zocchi, L. Moretta, and A. Poggi.** 2001. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol* **31**:1656-1665.
44. **Stacey, A. R., P. J. Norris, L. Qin, E. A. Haygreen, E. Taylor, J. Heitman, M. Lebedeva, A. DeCamp, D. Li, D. Grove, S. G. Self, and P. Borrow.** 2009. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* **83**:3719-3733.
45. **Tasca, S., G. Tambussi, S. Nozza, B. Capiluppi, M. R. Zocchi, L. Soldini, F. Veglia, G. Poli, A. Lazzarin, and C. Fortis.** 2003. Escape of monocyte-derived dendritic cells of HIV-1 infected individuals from natural killer cell-mediated lysis. *AIDS* **17**:2291-2298.
46. **Ugen, K. E., and S. B. Nyland.** 2006. Injecting drugs of abuse and immunity: implications for HIV vaccine testing and efficacy. *Springer seminars in immunopathology* **28**:281-287.
47. **Vallejo, R., O. de Leon-Casasola, and R. Benyamin.** 2004. Opioid therapy and immunosuppression: a review. *Am J Ther* **11**:354-365.
48. **Wang, J., R. A. Barke, J. Ma, R. Charboneau, and S. Roy.** 2008. Opiate abuse, innate immunity, and bacterial infectious diseases. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **56**:299-309.

SECTION 6 : CONCLUSION

Seulement une minorité des patients guérissent spontanément de l'infection par le VHC et les causes exactes demeurent inconnues. La littérature jusqu'à présent suggère que plusieurs facteurs, notamment génétiques, viraux et immunitaires, sont probablement impliqués dans la guérison spontanée. Quant aux facteurs immunitaires, il a été démontré par plusieurs études *in vitro* et *in vivo* qu'une réponse immunitaire adaptative forte et soutenue est cruciale pour l'élimination du VHC. Cependant, les éléments responsables du développement et du maintien de cette réponse adaptative ne sont pas bien définis.

La différenciation de lymphocytes T naïfs en cellules effectrices est induite par les cellules présentatrices d'antigènes, dont les DC, alors que la maturation de DC immunogéniques peut être régulée par les cellules NK. De plus, l'activité des cellules NK peut également être modulée par les DC. Dans le cadre du projet de doctorat, nous avons alors tenté d'analyser les différentes interactions entre les cellules NK, les DC et les lymphocytes T afin d'identifier des dysfonctions qui pourraient potentiellement être associées avec la persistance du VHC. Ces interactions ont été décortiquées en cinq étapes (Figure 12) :

- #1 capacité des DC à moduler les cellules NK
- #2 capacité des cellules NK à lyser les cellules cibles
- #3 capacité des cellules NK à promouvoir la réponse Th1
- #4 capacité des cellules NK à lyser les DC immatures
- #5 capacité des DC à induire des lymphocytes T effecteurs

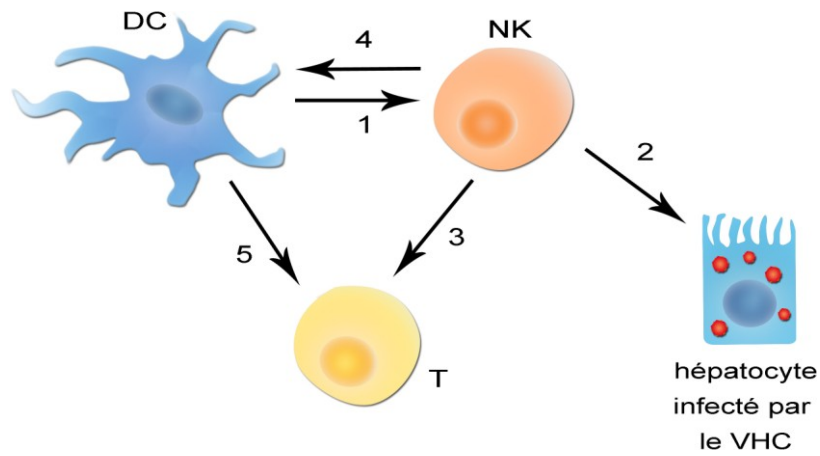


Figure 12: Les interactions entre les cellules NK, les DC et les lymphocytes T.

Légende : La conclusion de la thèse se concentre sur les différentes interactions entre l'immunité innée et adaptative qui seront décortiquées en 5 étapes : #1 capacité des DC à moduler les cellules NK ; #2 capacité des cellules NK à lyser les cellules cibles; #3 capacité des cellules NK à promouvoir la réponse Th1 ; #4 capacité des cellules NK à lyser les DC immatures ; #5 capacité des DC à induire des lymphocytes T effecteurs.

6.1 Étape #1 Capacité des DC à moduler les cellules NK

Afin de distinguer les DC *ex-vivo* utilisées dans le manuscrit 2 et les DC dérivées des monocytes dans le manuscrit 3, les DC *ex-vivo* seront désignées « DC » et les DC dérivées des monocytes seront désignées « MDDC » tout au long de la conclusion.

6.1.1 Sommaire des résultats

La littérature suggère que l'activation des cellules NK par les DC est en effet une pré-activation permettant aux cellules NK d'accomplir leurs fonctions au maximum de leur capacité. Nous avons donc étudié la capacité des DC matures à activer les cellules NK. L'activation des cellules NK dépend des cytokines produites par les DC et de la proximité entre ces deux types de cellules afin de permettre la sécrétion de ces cytokines au niveau de la synapse immunologique. Parmi ces cytokines se retrouvent l'IL-12 et l'IL-15. Nous avons étudié en premier lieu la capacité des DC *ex-vivo* à produire de l'IL-12 en réponse à des ligands de TLR. Tel que démontré dans le manuscrit 2, nous avons observé que les DC myéloïdes *ex-vivo* sécrètent des quantités normales d'IL-12 en réponse au LPS, mais des quantités supérieures d'IL-12 en réponse à l'ARN simple brin (ssRNA, de *single stranded RNA*), et ce autant chez les patients ayant guéri spontanément que chez les patients chroniquement infectés. En deuxième lieu, nous avons étudié la capacité des MDDC à produire de l'IL-12 et de l'IL-15 en réponse aux mêmes ligands TLR. Tel que décrit dans le manuscrit 3, nous avons observé aucune différence quant à la production d'IL-12 et d'IL-15 par les MDDC de patients infectés (phases aiguë et chronique), de patients ayant résolu spontanément et de contrôles non infectés. En troisième lieu, nous avons examiné la capacité des MDDC maturées au LPS ou au ssRNA, à activer les cellules NK. Nous avons noté que les MDDC de patients infectés (phases aiguë et chronique), de patients ayant résolu spontanément et de contrôles non infectés, ont tous la même capacité à induire la sécrétion de cytokines et la dégranulation par les cellules NK en présence de cellules tumorales et en présence de MDDC autologues. Nous avons toutefois noté une diminution de la fréquence de cellules NK produisant uniquement de l'IFN- γ (CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) et représentant moins de 3% des cellules NK totales. Cette diminution a été observé autant chez les patient infectés (phases aiguë et chronique) et ayant résolu que chez les utilisateurs de drogues non infectés. Ceci suggère que l'infection par le VHC ne serait pas entièrement en cause. Les autres facteurs possibles seront discutés dans les prochaines sections.

Dans le manuscrit 3, nous avons également identifié un nouveau mécanisme de régulation des cellules NK par les MDDC. Nous avons observé que les MDDC immatures ont la capacité d'inhiber la sécrétion de cytokines, la dégranulation en présence de cellules tumorales et la dégranulation en présence de MDDC autologues par les cellules NK. Cependant, les MDDC de patients chroniquement infectés inhibent moins la sécrétion de TNF- α par les cellules NK en comparaison avec ceux des patients de la phase aiguë. L'inhibition des cellules NK par les MDDC immatures serait peut-être un mécanisme utilisé par les MDDC afin que les cellules NK demeurent au repos en absence d'infection afin de limiter l'immuno-pathologie en périphérie. D'autre part, il est également possible que ce mécanisme soit utilisé pour inhiber les cellules NK après résolution d'une infection afin de limiter encore une fois l'immuno-pathologie.

6.1.2 Conclusion et perspectives

En résumé, nous avons démontré que les DC et les MDDC de patients infectés par le VHC sécrètent des niveaux normaux d'IL-12 et d'IL-15, toutes deux impliquées dans l'activation des cellules NK. De plus, nous n'avons observé aucun défaut quant à la capacité globale des MDDC de patients infectés par le VHC à induire la production de cytokines et la dégranulation par les cellules NK.

De plus, nous avons démontré pour la première fois la capacité des MDDC immatures à inhiber la fonction des cellules NK. En perspective, il serait intéressant d'identifier les mécanismes responsables. En effet, cette inhibition pourrait être dépendante du contact entre les cellules NK et les DC, et ainsi impliquer la surexpression de ligands inhibiteurs ou l'absence de ligands activateurs spécifiques pour des récepteurs de cellules NK. Il est également possible que cette inhibition soit indépendante du contact et plutôt dépendante de molécules solubles anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou le TGF- β . Finalement, il est aussi possible que la diminution de la fréquence de cellules NK fonctionnelles en présence de MDDC immatures soit causée par l'élimination de ces cellules NK par les MDDC.

6.2 Étape #2 Capacité des cellules NK à lyser des cellules cibles

6.2.1 Sommaire des résultats

Les cellules NK sont capables de lyser des cellules tumorales et infectées. Par conséquent, nous avons mesuré l'activité cytotoxique des cellules NK pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC, afin d'évaluer la contribution des cellules NK dans la guérison spontanée de l'infection. À défaut d'avoir le système de culture *in vitro* du VHC dans notre laboratoire, nous avons mesuré la dégranulation des cellules NK en présence d'une lignée cellulaire de leucémie classiquement utilisée, les cellules K562.

Tel que mentionné dans la section précédente, nous avons observé dans le manuscrit 3 que les MDDC de patients infectés par le VHC ont une capacité normale à potentialiser la dégranulation des cellules NK en réponse à des cellules cibles. Dans le manuscrit 1, nous avons évalué la capacité de dégranulation des cellules NK *ex-vivo* pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC. Nous avons démontré que la capacité de dégranulation des cellules NK est augmentée pendant la phase aiguë de l'infection chez tous les patients infectés indépendamment de l'évolution de l'infection. Par conséquent, les cellules NK sont activées pendant la phase aiguë, mais cette activation n'est pas spécifiquement associée avec la guérison spontanée ou l'évolution chronique. Ceci suggère que les cellules NK jouent possiblement un rôle dans la lyse d'hépatocytes infectés pendant la phase aiguë de l'infection, mais nous n'avons pas observé de corrélation entre la dégranulation des cellules NK et la virémie. Dans cette étude nous avons également étudié l'expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs et activateurs, puis nous avons observé une diminution de l'expression du récepteur inhibiteur NKG2A par les cellules NK de patients ayant résolu spontanément. Ceci pourrait être un mécanisme développé par les cellules NK afin d'échapper aux signaux inhibiteurs provenant d'hépatocytes infectés exprimant fortement le ligand pour le NKG2A, le HLA-E (162).

Au moment où a débuté ce projet, rien n'était connu quant à l'activité des cellules NK pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC. Cependant, peu avant et peu après la publication de notre manuscrit 1 en 2010, deux études ont été publiées à ce sujet. La première étude a été conduite auprès d'une cohorte d'italiens dont l'identification de la phase aiguë a été basée sur la présence de symptômes

cliniques tels que l'élévation des ALT (212). En accord avec nos résultats, cette étude a observé une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK pendant la phase aiguë, et ce autant chez les patients ayant résolu spontanément que chez les patients avec une évolution chronique. Parallèlement à la cytotoxicité directe, ce groupe a également examiné la dégranulation des cellules NK, et a observé une augmentation de la dégranulation des cellules NK KIR2DL2/L3/S2⁺ de patients ayant résolu spontanément. Cette observation est la première à créer un lien potentiel entre la fonction des cellules NK et l'étude génétique parue en 2004 démontrant l'association du KIR2DL3 avec la résolution spontanée de l'infection (133). Dans le cadre de notre étude, nous avons également tenté d'établir un lien fonctionnel entre les cellules NK et le génotype des KIR2DL2/L3, mais nous n'avons pas obtenu de résultats concluants en raison du nombre limité de patients inclus dans l'étude. La deuxième étude ayant examiné les cellules NK pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC a été effectuée auprès d'une cohorte des États-Unis (213). Cette étude a observé une augmentation modeste de la dégranulation des cellules NK pendant la phase aiguë, la phase chronique et après résolution de l'infection par le VHC. Ce groupe a plutôt démontré que l'élimination spontanée du VHC pendant la phase aiguë est associée avec une faible fréquence de cellules NK NKp30⁺NKp46⁺, CD161⁺ et NKG2D⁺. Fait intéressant, une augmentation de la cytotoxicité et de l'expression du NKp30 par les cellules NK est associée avec la protection contre l'infection par le VHC chez des individus à haut risque d'être infectés (214).

6.2.2 Conclusion et perspectives

En résumé, nous avons démontré que les cellules NK ont une capacité élevée de dégranulation pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC, mais que ceci est indépendant de l'évolution de l'infection. De plus, nos résultats sont en accord avec d'autres études (212, 213). Cependant, en ce qui concerne le phénotype des cellules NK, l'expression de récepteurs inhibiteurs et activateurs semble varier d'une étude à l'autre.

Bien que l'utilisation des cellules cibles K562 soit simple et utile pour évaluer la capacité cytotoxique des cellules NK, cette lignée tumorale ne représente pas nécessairement correctement des hépatocytes infectés par le VHC. En effet, les K562 ont une diminution de l'expression des CMH de classe I, mais une augmentation de l'expression des ligands pour le NKG2D. Par conséquent, l'utilisation des K562 comme cellules cibles mesure la réponse des cellules NK en absence de signaux

provenant des KIR et du NKG2A, mais en présence de signaux provenant du NKG2D. Plusieurs études ont évalué l'expression de ligands par des hépatocytes infectés par le VHC. Il a été démontré que les hépatocytes infectés par un réplicon ou des protéines du VHC ont une diminution de l'expression de certains ligands du NKG2D comme le MIC-A (215), une augmentation de l'expression du HLA-E (162), mais une expression normale des HLA-A, -B, -C (152). Par conséquent, l'utilisation d'hépatocytes infectés par le VHC comme cellules cibles mesure la réponse des cellules NK en présence de signaux provenant des KIR et du NKG2A, mais en absence de signaux provenant du NKG2D. Évidemment, l'utilisation d'hépatocytes infectés par le VHC plutôt que de K562 pourrait induire une réponse très différente par les cellules NK.

Deux études ont déjà démontré que les cellules NK stimulées avec de l'IL-2 (152) ou de l'IFN- α (153), mais non au repos, peuvent induire la lyse d'hépatocytes infectés par le VHC. Cependant, ces études ont utilisé des cellules NK isolées de donneurs sains. Une seule expérience effectuée par Stegmann et al. (153) a démontré que les cellules NK de patients ayant récemment débuté une thérapie à base d'IFN- α sont en mesure de lyser des hépatocytes infectés sans stimulation préalable *in vitro*. Ces études suggèrent qu'une activation quelconque est nécessaire pour que les cellules NK induisent la lyse d'hépatocytes infectés. Le fait que les cellules NK sont habituellement capables d'induire la lyse de cellules tumorales ou infectées sans activation préalable, suggère que l'activation nécessaire pour la lyse d'hépatocytes infectés est possiblement importante pour contrebalancer les effets inhibiteurs induits par le VHC. En perspective, il serait intéressant d'isoler des cellules NK de patients pendant la phase aiguë, la phase chronique ou après résolution de l'infection par le VHC, et d'évaluer leur capacité à lyser des hépatocytes infectés par le VHC. Ce type d'études permettrait de mieux comprendre le rôle des cellules NK dans la guérison spontanée de l'infection par le VHC.

Non seulement il pourrait y avoir des différences entre la lyse de K562 et d'hépatocytes infectés, mais il pourrait également avoir des différences entre la lyse dépendante et indépendante des anticorps. La lyse dépendante des anticorps, nommé ADCC, est médiée par le récepteur activateur CD16 aussi nommé Fc γ RIII. Le CD16 se lie à la région Fc des anticorps lorsque ceux-ci sont liés à des cellules infectées, pour envoyer un signal activateur aux cellules NK qui peuvent ensuite induire la lyse des cellules infectées. Par ailleurs, des études cliniques évaluant l'efficacité d'un vaccin préventif contre le VIH-1 suggèrent que l'ADCC y joue un rôle. En effet cette étude clinique de phase III menée en

Thaïlande a démontré que ce vaccin contre l'infection du VIH-1 a une efficacité modeste de 30% (216). Des études d'immunogénicité ont démontré que ce vaccin semble induire des anticorps induisant l'ADCC plutôt que des anticorps neutralisant et des réponses médiées par les CTL (217). De plus, d'autres études ont démontré la présence d'anticorps induisant l'ADCC pendant la phase aiguë de l'infection par le VIH (218) et ont observé que ceux-ci corrèlent inversement avec la virémie (219). Des anticorps puissants induisant l'ADCC sont également présents chez la majorité des patients capables de contrôler la virémie sans traitements, nommés contrôleurs élités (220). Finalement, les cellules NK de ces patients contrôleurs élités sont en mesure de lyser efficacement des cellules cibles via l'ADCC. Cependant, le rôle de l'ADCC dans la résolution de l'infection par le VHC n'est pas bien connu. Une étude suggère que l'activité ADCC des cellules NK est légèrement augmentée chez les patients ayant résolu spontanément (213), mais d'autres études plus complètes seront nécessaires. Plus particulièrement, des études évaluant la capacité des cellules NK à induire la lyse d'hépatocytes infectés via l'ADCC.

6.3 Étape #3 Capacité des cellules NK à promouvoir la réponse Th1

6.3.1 Sommaire des résultats

Dans le manuscrit 1, nous avons étudié la cinétique de l'activité des cellules NK et de la réponse immunitaire adaptative spécifique pour le VHC. Nous avons démontré que la dégranulation et la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK précèdent ou coïncident avec la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ qui est mesurée par la production d'IFN- γ en réponse à des peptides dérivés du VHC. Ceci suggère que le VHC est détecté par l'immunité innée et que celle-ci participe possiblement au contrôle du VHC durant le processus du développement de l'immunité adaptative. Il est également possible que les cellules NK participent à l'activation directe ou indirecte de l'immunité adaptative par divers moyens.

Toujours dans le manuscrit 1, nous avons observé une corrélation positive entre la dégranulation des cellules NK et la magnitude de la réponse adaptative médiée par les lymphocytes T spécifiques pour le VHC. Une explication possible pour cette corrélation est que la lyse d'hépatocytes infectés par le VHC augmenterait la disponibilité de cellules apoptotiques pouvant être phagocytées par les DC. Une

fois activées, ces DC migreraient alors vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présenteraient des peptides dérivés du VHC aux lymphocytes T. Donc la dégranulation des cellules NK pourrait être un moyen indirect de moduler l'immunité adaptative.

Les cellules NK sécrètent plusieurs cytokines aux propriétés antivirales et immuno-modulatrices, notamment l'IFN- γ . Dans le manuscrit 1, nous avons évalué la production d'IFN- γ par les cellules NK *ex-vivo* lorsque celles-ci sont mises en présence des cellules cibles K562. Nous avons observé une diminution de la fréquence de cellules NK produisant uniquement de l'IFN- γ (% CD107a⁻IFN- γ ⁺) chez tous les patients indépendamment de l'évolution de l'infection et de la phase de l'infection en comparaison avec les contrôles non infectés. De plus, les individus exposés mais non infectés produisent des niveaux intermédiaires d'IFN- γ donc des niveaux plus élevés que les patients infectés mais plus bas que les contrôles non infectés. Dans le manuscrit 3, nous avons observé des résultats similaires lorsque les cellules NK sont pré-activées par des MDDC maturées avec du ssRNA, et ensuite mises en présence de cellules cibles. Nous avons d'abord observé que les MDDC maturées avec du ssRNA induisent la production d'IFN- γ par les cellules NK chez tous les groupes de patients infectés par le VHC. Par contre, nous avons noté une diminution de la fréquence de cellules NK produisant uniquement de l'IFN- γ (% CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) chez les patients atteints d'une infection aiguë ou chronique par le VHC, les patients ayant guéri spontanément et les individus exposés non infectés, en comparaison avec les contrôles non infectés. Plusieurs facteurs pourraient potentiellement expliquer la diminution de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK. Premièrement, nos observations pourraient suggérer que le VHC inhibe la fonction des cellules NK *in vivo* tel que démontré par les études *in vitro* (146-148, 151). En effet, ces études ont démontré que la protéine recombinante E2 du VHC, les virions du VHC, ainsi que des hépatocytes infectés par le VHC inhibent la fonction des cellules NK. Deuxièmement, une autre étude a suggéré que l'IFN- α qui est induit lors de l'infection par le VHC et qui est sécrété par soit les hépatocytes ou les DC, pourrait être en cause pour la faible production d'IFN- γ par les cellules NK (166). Par contre, le VHC n'est probablement pas la cause principale puisque même les individus exposés mais non infectés ont une diminution de la production d'IFN- γ . Troisièmement, le fait que ces individus consomment des opioïdes suggère que la consommation de drogues pourrait possiblement être en cause. En effet, il a été démontré que la consommation d'opioïdes peut affecter la fonction du système immunitaire incluant celle des cellules NK (221, 222). Finalement, il est possible qu'un défaut

au niveau des DC entraîne la faible production d'IFN- γ . Effectivement, dans le manuscrit 3 nous avons observé une corrélation directe entre la fréquence de cellules NK produisant uniquement l'IFN- γ (% CD107a⁻IFN- γ ⁺TNF- α ⁻) et la fréquence de DC matures possiblement présentant en trans l'IL-15 par l'IL-15R α (% IL-15⁺IL-15R α ⁺). Il est déjà connu que l'IL-15 est important pour la survie et la prolifération des cellules NK, mais nos résultats suggèrent qu'il pourrait également être impliqué dans la régulation de la production d'IFN- γ .

Dans le manuscrit 1, contrairement à la dégranulation, nous avons démontré une corrélation inverse entre la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK et l'immunité adaptative médiée par les lymphocytes T spécifiques pour le VHC. Ce résultat est inattendu puisque la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK induit la maturation des DC qui induisent à leur tour le développement de lymphocytes T effecteurs (92, 93). De plus, la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK en collaboration avec les DC matures favorise directement le développement d'une réponse Th1 (223). Cependant dans cette étude, seulement les cellules NK isolées d'organes lymphoïdes secondaires mais pas du sang périphérique sont capables d'induire une réponse effectrice Th1.

Tel que mentionné dans la section précédente, deux autres études ont examiné la fonction des cellules NK pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC. La première a observé une augmentation de la production d'IFN- γ par les cellules NK chez tous les patients pendant la phase aiguë indépendamment de l'évolution de l'infection, en comparaison avec les contrôles non infectés (212). Cependant contrairement à notre protocole, cette étude a évalué la sécrétion d'IFN- γ suite à la stimulation des cellules NK avec de l'IL-12 plutôt qu'avec des cellules cibles, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre cette étude et la nôtre. En ce qui concerne l'étude d'Alter et al. (213), les auteurs n'ont pas observé de différences significatives entre les patients infectés et les contrôles non infectés quant à la production d'IFN- γ par les cellules NK.

6.3.2 Conclusion et perspectives

En résumé, nous avons démontré que la réponse maximale des cellules NK précède ou coïncide avec la réponse maximale des lymphocytes T spécifiques pour le VHC. Ceci suggère que les cellules NK pourraient être impliquées dans le contrôle transitoire du VHC durant le processus du

développement de l'immunité adaptative. De plus, nous avons démontré une corrélation positive entre la réponse adaptative médiée par les lymphocytes T spécifiques pour le VHC et la dégranulation des cellules NK, mais une corrélation négative entre cette même réponse adaptative et la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK. Finalement, nous avons observé une diminution de la fréquence des cellules NK produisant uniquement de l'IFN- γ chez tous les patients infectés par le VHC indépendamment de l'évolution de l'infection, ainsi que chez les individus exposés mais non infectés, en comparaison avec les contrôles non infectés.

En perspective, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la diminution de la fréquence de cellules NK produisant uniquement de l'IFN- γ . Cette diminution n'est pas accompagnée d'une diminution de la fréquence totale de cellules sécrétant de l'IFN- γ , ni de changements au niveau de la fréquence de cellules effectuant deux ou trois fonctions. Néanmoins, étant donné que l'IFN- γ contrôle la réplication du VHC, induit la maturation des DC et participe au développement des cellules effectrices Th1, il est possible que cette diminution d'IFN- γ ait des conséquences sur l'évolution de l'infection par le VHC.

Par ailleurs, un nouveau mécanisme de modulation de l'immunité adaptative par les cellules NK a récemment été décrit. Cette étude a démontré que les cellules NK sont capables de lyser les lymphocytes T CD4⁺ et par conséquent de supprimer la fonction des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques dans le contexte de l'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV, de *Lymphocytic choriomeningitis virus*) chez la souris (224). Cette suppression des lymphocytes T peut être bénéfique ou non pour l'hôte dépendamment de la dose d'infection. À haute dose, la suppression des lymphocytes T prévient l'immuno-pathologie et la mort des animaux, mais entraîne la persistance du virus jusqu'à ce que le système immunitaire l'élimine éventuellement. En revanche, à des doses intermédiaires d'infection, les lymphocytes T ne sont pas entièrement supprimés et entraînent l'immuno-pathologie et la mort des souris. Des études ultérieures seront requises afin de déterminer si ce phénomène se produit chez l'humain et s'il survient dans le contexte de l'infection par le VHC, donc si les cellules NK participent à la suppression des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le VHC en induisant la lyse des lymphocytes T CD4⁺.

6.4 Étape #4 La capacité des cellules NK à lyser les DC immatures

6.4.1 Sommaire des résultats

Dans le manuscrit 3, nous avons étudié la capacité des cellules NK à lyser les MDDC immatures. Les études suggèrent que les DC qui engouffrent des corps apoptotiques en absence de signaux de danger sont tolérogéniques, c'est-à-dire qu'elles conservent un phénotype immature, mais qu'elles peuvent migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et induire une réponse immunitaire adaptative tolérogénique (70). Pour limiter le développement de réponses tolérogéniques, les cellules NK lysent probablement les DC immatures dans les tissus enflammés (110). Dans notre étude nous avons observé que les cellules NK activées et à un moindre degré les cellules NK au repos, peuvent induire la lyse des MDDC immatures. Tel que démontré précédemment, les MDDC immatures sont beaucoup plus sensibles que les MDDC matures à la lyse médiée par les cellules NK. Cependant, aucune différence n'a été observée quant à la lyse des MDDC par les cellules NK, entre les différents groupes et stades d'infections étudiés, soit les patients infectés pendant la phase aiguë ou chronique, les patients ayant résolu spontanément et les contrôles non infectés. Nos résultats sont en accord avec nos résultats du manuscrit 1 démontrant que la lyse de cellules tumorales par des cellules NK *ex-vivo* est normale et même augmentée pendant la phase aiguë du VHC en comparaison avec des contrôles non infectés. De plus, nos résultats sont également conformes avec nos résultats du manuscrit 2 démontrant que les DC myéloïdes et plasmacytoïdes *ex-vivo* semblent immunogéniques et non tolérogéniques, c'est-à-dire qu'elles répondent normalement ou de façon accrue à des ligands de TLR pendant la phase aiguë du VHC en comparaison avec des contrôles non infectés.

6.4.2 Conclusion et perspectives

En résumé, la lyse des MDDC immatures par les cellules NK est intacte pendant l'infection par le VHC. Donc, la présence de DC immunogéniques et non tolérogéniques dans les organes lymphoïdes secondaires devrait entraîner le développement de lymphocytes T effecteurs. Cependant, il est possible que les cellules NK modulent de façon différente les DC infectées ou qui sont entrées en contact avec des virus. En effet, deux études ont démontré que l'infection de DC par des virus peut moduler la sensibilité des DC à la lyse médiée par les cellules NK. La première étude a utilisé des MDDC infectées

in vitro par le VIH et a démontré que l'infection de MDDC immatures diminue la sensibilité alors que l'infection de MDDC matures augmente la sensibilité à la lyse médiée par les cellules NK (130). Ceci a pour conséquence de privilégier la survie de MDDC potentiellement tolérogéniques. La deuxième étude a été menée auprès de souris infectées par le MCMV (225). Dans ce modèle, les auteurs ont observé que les DC infectées par le MCMV sont éliminées par les cellules NK. L'élimination de DC présentant des antigènes du MCMV a alors pour conséquence de réduire la fréquence de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ effecteurs et de promouvoir la persistance du virus.

L'ARN du VHC est détecté dans les DC périphériques de patients chroniquement infectés [révisé dans (226)], mais la capacité du VHC à infecter et à se répliquer dans les DC demeure controversée. Actuellement un des seuls clones du VHC adapté à la culture cellulaire, le clone JFH-1 isolé d'un patient atteint d'une infection fulgurante du VHC (de *Japanese Fulminant Hepatitis 1*), n'infecte pas les DC *in vitro* (227, 228). Cependant il est possible que le simple contact des DC avec le VHC lors de la phagocytose d'hépatocytes infectés en absence de répllication virale dans les DC, soit suffisant pour moduler les DC. En perspective, il serait intéressant d'utiliser le système de culture cellulaire JFH-1 pour examiner si le contact des DC avec des hépatocytes infectés par le VHC affecte la sensibilité des DC à la lyse médiée par les cellules NK.

Par ailleurs dans le cadre de mon projet, nous avons étudié la capacité des cellules NK à lyser les MDDC, mais en raison du nombre limité de ces cellules nous n'avons pas examiné la capacité des cellules NK à induire la maturation des MDDC. En perspective, il serait important d'étudier cette interaction entre les cellules NK et les DC. Dans le manuscrit 2, nous avons observé des différences entre les patients chroniquement infectés et ceux guérissant spontanément quant à la capacité des DC *ex-vivo* à répondre à des stimulus. Pour cette raison, il est possible que les cellules NK soient impliquées et qu'elles régulent l'activité des DC différemment chez ces deux groupes de patients.

6.5 Étape #5 La capacité des DC à induire des lymphocytes T effecteurs

6.5.1 Sommaire des résultats

Le développement de lymphocytes T effecteurs par les DC requiert plusieurs signaux, notamment la présentation de peptides par le CMH, la présence de molécules de co-stimulation et la production de

cytokines. Dans le manuscrit 2, nous avons d'abord étudié la capacité des DC myéloïdes *ex-vivo* à engouffrer des antigènes par endocytose en utilisant des billes de dextran fluorescentes. Nous avons observé que la capacité d'endocytose des DC myéloïdes est semblable chez tous les patients infectés par le VHC indépendamment de l'évolution de l'infection et de la phase d'infection. De plus, nous avons observé une corrélation positive entre la charge virale et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) qui représente la quantité de billes fluorescentes engouffrées par les DC. Ceci suggère que la charge virale n'affecte pas l'endocytose d'antigènes par les DC et qu'elle peut même l'augmenter.

Nous avons ensuite étudié le phénotype des DC myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC), notamment l'expression de molécules de co-stimulation et de récepteurs co-inhibiteurs. Nous avons observé que les pDC de tous les patients infectés ont un phénotype immature indépendamment de l'évolution de l'infection, en comparaison avec les contrôles non infectés. De plus, ce phénotype est plus marqué chez les patients ayant résolu spontanément pendant la phase aiguë tardive et après résolution. Malgré le phénotype immature, les pDC de patients ayant résolu spontanément sont hyperréactives au ssRNA en comparaison avec les patients chroniquement infectés et les contrôles non infectés, surtout en ce qui concerne l'augmentation de l'expression du CD86. De plus, cette hyperréactivité corrèle inversement avec la charge virale suggérant que le VHC stimule de façon chronique les pDC de façon à ce qu'elles ne répondent pas aux stimulations subséquentes par le ssRNA *in vitro*.

Nous avons par la suite examiné la sécrétion de cytokines par les mDC suite à une stimulation avec des ligands de TLR. Tel que discuté dans la section 6.1, les DC sécrètent entre autres de l'IL-12 qui active les cellules NK et favorise l'orientation des lymphocytes T CD4⁺ vers la lignée Th1 qui possède des propriétés antivirales. Dans le manuscrit 2, nous avons démontré une augmentation de la production d'IL-12 par les mDC *ex-vivo* stimulées avec du ssRNA chez tous les patients infectés quelle que soit l'évolution de l'infection ou la phase d'infection, en comparaison avec les contrôles non infectés. L'IL-6 et le TNF- α sont deux cytokines pro-inflammatoires également sécrétées par les mDC. Nous avons donc examiné la fréquence des mDC produisant toutes les trois cytokines (IL-6⁺IL-12⁺TNF- α ⁺) et avons observé une hyperréactivité des mDC chez tous les patients infectés pendant la phase aiguë précoce en comparaison avec les contrôles non infectés. Cependant pendant la phase aiguë tardive et la phase de suivi, cette hyperréactivité est soutenue seulement chez les patients ayant résolu spontanément,

alors que la réactivité des mDC de patients chroniquement infectés est semblable à celle des mDC de contrôles non infectés. Nos résultats suggèrent que l'hyperréactivité des mDC est peut-être nécessaire au développement ou au maintien de lymphocytes T effecteurs spécifiques pour le VHC qui sont associés avec la résolution spontanée de l'infection. De plus, nous avons démontré que les mDC de patients chroniquement infectés ne sont pas hyperréactives mais ne sont pas globalement dysfonctionnelles non plus. Ceci est en accord avec d'autres études démontrant que l'immunité adaptative de patients chroniquement infectés est globalement fonctionnelle et que seuls les lymphocytes T spécifiques pour le VHC mais pas pour d'autres virus sont dysfonctionnels.

6.5.2 Conclusions et perspectives

En résumé nous avons démontré que les mDC de patients infectés par le VHC ont une capacité normale à internaliser des corps étrangers par endocytose. Nous avons également observé que les pDC de patients ayant résolu spontanément ont un phénotype plus immature en comparaison avec des patients chroniquement infectés et des contrôles non infectés. Finalement, nous avons démontré que les pDC et les mDC chez tous les patients sont hyperréactives pendant la phase aiguë précoce, mais que cette hyperréactivité est soutenue seulement chez les patients ayant résolu spontanément pendant la phase aiguë tardive et la phase de suivi.

Bien que les mDC semblent fonctionnelles quant à leur capacité à engouffrer des corps étrangers, il est possible que des déficiences existent au niveau de la dégradation de protéines en peptides ou au niveau de la présentation de peptides aux lymphocytes T via les molécules de CMH. En effet, la façon dont les DC présentent des antigènes du VHC par le CMH de classe I aux lymphocytes T CD8+ n'est pas bien définie. Normalement, les DC présentent des peptides provenant de protéines endogènes via le CMH de classe I, notamment des protéines virales lors de l'infection des DC par un virus. Cependant, l'infection des DC par le VHC est très controversée. Certaines études ont démontré la présence de l'ARN du VHC dans les DC, mais sa prévalence chez les patients infectés est faible (173, 229-231). De plus, la charge virale détectée dans les DC n'est pas considérable (173, 229). Ces études suggèrent donc que la capacité du VHC à infecter les DC est probablement faible ou absente. Néanmoins, il a été démontré que le VHC se lie aux récepteurs DC-SIGN et L-SIGN à la surface des DC (232, 233). La liaison du VHC à ces récepteurs pourrait entraîner son internalisation et sa présentation par le CMH de

classe I. Cependant sans réplication virale robuste, la synthèse de nouvelles protéines virales est probablement insuffisante pour la présentation de peptides dérivés du VHC par le CMH de classe I.

Mise à part l'infection des DC par le VHC, d'autres mécanismes sont probablement responsables pour la présentation de peptides dérivés du VHC par le CMH de classe I. Un mécanisme possible est la présentation croisée d'antigènes exogènes qui consiste en la présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe I plutôt que la présentation classique par le CMH de classe II. La présentation croisée survient lorsque les DC internalisent des cellules infectées apoptotiques et présentent des antigènes viraux par le CMH de classe I. Par conséquent, la présentation croisée dépend de la survie des cellules infectées. Dans le contexte de l'infection par le VHC, il a été démontré que le VHC n'est pas cytopathique donc la mort des hépatocytes médiée par le VHC est probablement peu fréquente. Par contre dans le manuscrit 1, nous avons démontré que la lyse de cellules cibles par les cellules NK corrèle directement avec la magnitude de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T spécifiques pour le VHC. Ainsi, les cellules NK pourraient contribuer à la présentation croisée d'antigènes du VHC par les DC, mais il n'est cependant pas connu si la présentation croisée est directement impliquée dans le développement de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs spécifiques pour le VHC. En perspective, il serait intéressant d'évaluer l'implication de la présentation croisée dans le développement de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs spécifiques pour le VHC et de déterminer s'il y a des défauts au niveau de la présentation croisée chez les patients chroniquement infectés qui pourraient potentiellement expliquer l'absence d'une réponse immunitaire robuste médiée par les lymphocytes T chez ces patients.

Comme autre perspective, il serait intéressant d'examiner plus en détails la capacité des DC à dégrader et présenter des peptides dérivés du VHC (Figure 13). Il a déjà été démontré que le VHC n'infecte pas les DC *in vitro* et qu'il n'induit pas la maturation des DC (234). Par contre, cette même étude a démontré que la phagocytose d'hépatomes apoptotiques infectés par le VHC induit la maturation des DC. Dans notre laboratoire, nous avons récemment mis en place ce système de culture cellulaire du VHC qui consiste à infecter une lignée cellulaire d'hépatome, nommé Huh-7.5, avec un clone du VHC, nommé JFH-1, isolé d'un patient atteint d'une infection fulgurante du VHC de génotype 2a (235-238). De plus, Jo J. *et al.* (169) ont développé une variante de ce système en introduisant une mutation dans la séquence du JFH-1 de façon à ce qu'un épitope dans la protéine NS5B du VHC (NS5B₂₅₉₄₋₂₆₀₂) soit reconnue par un clone de lymphocytes T CD8⁺ via le CMH de classe I HLA-A2. De plus, notre

laboratoire a également généré une lignée de lymphocytes T CD4⁺ spécifique pour l'épitope NS3₁₂₄₇₋₁₂₆₄ présenté par le CMH de classe II HLA-DR1 et dont la séquence est conservée parmi tous les génotypes du VHC. Avec tous ces outils accessibles, il serait alors réalisable de mettre au point un protocole examinant la dégradation et la présentation de peptides dérivés du VHC par les DC. Cet essai consisterait d'abord à infecter la lignée d'hépatomes avec le clone JFH-1 muté, à induire l'apoptose de cette lignée et à faire une co-culture de ces cellules apoptotiques avec des MDDC. Les MDDC phagocyteraient alors les cellules apoptotiques, dégraderaient les protéines du VHC en peptides et présenteraient ces peptides par le CMH de classe II et par le CMH de classe I probablement via la présentation croisée. Finalement, les MDDC seraient mises en culture avec le clone de lymphocytes T CD4⁺ spécifique pour le NS3₁₂₄₇₋₁₂₆₄ ou le clone de lymphocytes T CD8⁺ spécifique pour le NS5₂₅₉₄₋₂₆₀₂. La reconnaissance du VHC par les lymphocytes serait évaluée sur la base de sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ . Afin d'évaluer si l'infection par le VHC *in vivo* affecte la capacité des MDDC à dégrader et présenter des antigènes, des MDDC générées à partir de patients chroniquement infectés, de patients ayant résolu spontanément et de contrôles non infectés seraient utilisées. En parallèle, il serait intéressant d'utiliser des lymphocytes T spécifiques pour un autre virus comme contrôle. Par exemple, il serait possible d'induire l'apoptose de lymphocytes B infectés par le EBV (de *Epstein Barr Virus*), une méthode déjà mise au point dans notre laboratoire, et de mettre en co-culture les cellules apoptotiques avec les MDDC afin que ces dernières présentent des antigènes du EBV à un clone de lymphocytes T spécifiques pour le EBV. Cette expérience nous permettrait d'évaluer si c'est le simple contact entre les MDDC et le VHC qui module la capacité des MDDC à digérer et présenter des peptides aux lymphocytes T.

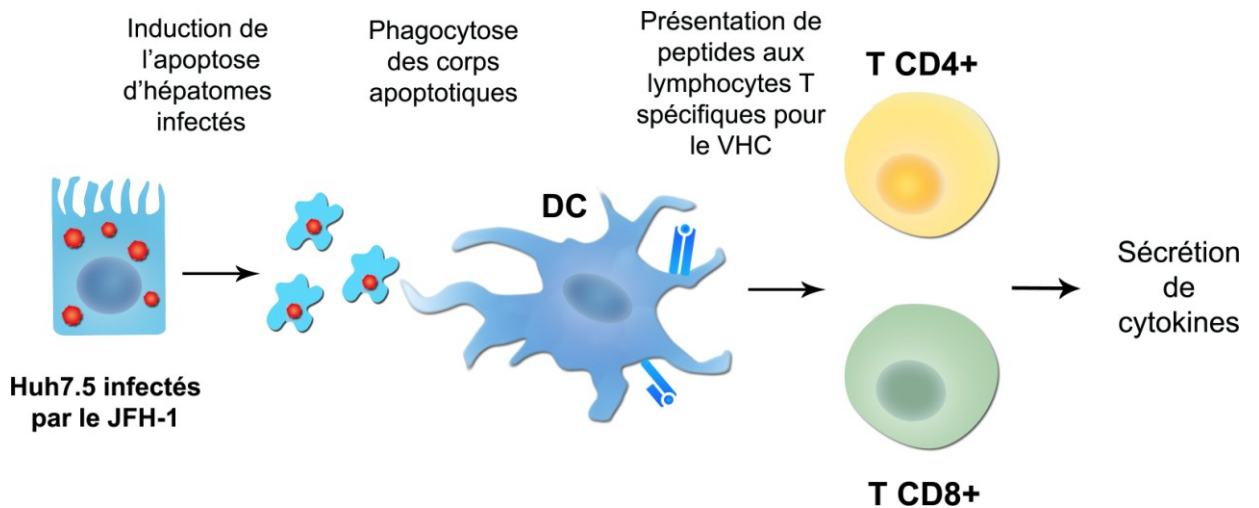


Figure 13 : Expérience future.

Légende : En perspective, il serait intéressant d'évaluer la capacité des DC à dégrader et présenter des antigènes du VHC aux lymphocytes T spécifiques pour le VHC. Nous avons récemment mis au point le système de culture cellulaire du VHC qui consiste à infecter la lignée d'hépatome Huh7.5 avec le clone JFH-1 du VHC. Avec cet outil, nous proposons d'induire l'apoptose des cellules Huh7.5 infectées et de les mettre en co-culture avec des DC dérivées de patients à différents stades d'infection par le VHC. Une fois que les DC auront phagocyté les corps apoptotiques, elles seront mises en co-culture avec un clone de lymphocytes T CD8⁺ spécifique pour un épitope de la protéine NS5 présenté par le CMH de classe I HLA-A2 ou avec une lignée de lymphocytes T CD4⁺ spécifique pour un épitope de la protéine NS3 présenté par le CMH de classe II HLA-DR1. La dégradation et la présentation de peptides par les DC seront évaluées sur la base de sécrétion de cytokines par les lymphocytes T suite à la reconnaissance du peptide.

6.6 Autres facteurs pouvant potentiellement moduler la réponse immunitaire spécifique pour le VHC

L'objectif principal de mon projet de doctorat est d'identifier des défauts au niveau de la fonction des cellules NK et des DC qui peuvent potentiellement expliquer la faible réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T spécifiques pour le VHC qui est associée avec la persistance de l'infection par le VHC. Cependant, d'autres mécanismes pourraient moduler le développement d'une réponse immunitaire contre le VHC, tels que l'activation de lymphocytes T effecteurs par des cellules autres que les DC, l'apparition de mutations permettant d'échapper aux lymphocytes T, le développement de lymphocytes T CD8⁺ dysfonctionnels, l'absence d'aide provenant des lymphocytes T CD4⁺ et la suppression des lymphocytes T effecteurs par les lymphocytes T régulateurs.

6.6.1 Activation de lymphocytes T CD8⁺ par des cellules autres que les DC

Certaines études ont démontré que les lymphocytes T CD8⁺ peuvent être activés non seulement dans les organes lymphoïdes secondaires mais également dans le foie. Dans cet organe on y retrouve d'autres APC, notamment des cellules Kupffer qui sont des macrophages résidant dans le foie. De plus, les cellules endothéliales du foie, les LSEC (de *liver sinusoidal endothelial cell*), ont également la capacité d'internaliser et de présenter des antigènes (239). Le foie contient aussi des cellules stellaires qui jouent un rôle central dans le développement de la fibrose, et qui peuvent également présenter des antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ (240). Dans le contexte de l'infection par le VHC, tous ces types de cellules pourraient alors internaliser, dégrader et présenter des antigènes du VHC aux lymphocytes T au niveau du foie. Par ailleurs comme le VHC et d'autres virus infectent les hépatocytes, plusieurs groupes ont tenté de déterminer si les hépatocytes peuvent activer des lymphocytes T CD8⁺ naïfs. Les études initiales *in vitro* ont démontré qu'en absence d'infection, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs en co-culture avec des hépatocytes sont activés de la même façon que les lymphocytes T en co-culture avec des DC (241). Cependant, contrairement aux lymphocytes T activés par les DC, ceux activés par les hépatocytes ont une durée de vie plus courte, et ceci est probablement causé par la présence de ICAM-1 (de *intercellular adhesion molecule-1*), mais l'absence d'autres molécules de co-stimulation à la surface des hépatocytes (242). Les études subséquentes *in vivo* utilisant des souris transgéniques ont ensuite

confirmé que les hépatocytes ont la capacité d'activer des lymphocytes T CD8⁺ naïfs (243, 244). Par contre, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ a néanmoins abouti à une tolérance, c'est-à-dire que ces lymphocytes n'ont pas causé de dommages hépatiques. De plus, cette tolérance semble causée par la mort de ces lymphocytes T induite par la faible expression du CD25 qui est la chaîne alpha du récepteur de haute affinité de l'IL-2, par la faible sécrétion d'IL-2 et par la forte expression de protéines pro-apoptotiques par ces lymphocytes T (245). Donc, l'activation de lymphocytes T CD8⁺ naïfs par les hépatocytes induit la mort des lymphocytes.

Un modèle a alors été proposé pour expliquer l'absence d'une réponse immunitaire adaptative robuste lors d'une infection chronique par le VHC (246). Ce modèle propose que lors des deux premiers mois suivant l'infection, donc le temps requis pour la détection de lymphocytes T spécifiques pour le VHC, les lymphocytes T CD8⁺ de haute avidité seraient activés dans le foie et par conséquent éliminés. Les lymphocytes T CD8⁺ de faible avidité restant seraient alors incapables de contrôler l'infection et causeraient la persistance du VHC. Cependant dans les cas de résolution spontanée, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs seraient activés dans les organes lymphoïdes secondaires plutôt que dans le foie. Ces cellules migreraient ensuite dans le foie où elles élimineraient les hépatocytes infectés.

D'autres études seront requises pour déterminer si les lymphocytes T spécifiques pour le VHC sont activés dans le foie par les hépatocytes ou par d'autres APC, et également pour déterminer l'impact de l'activation de ces lymphocytes dans le foie vs les organes lymphoïdes secondaires.

6.6.2 Mutations du VHC permettant d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T.

Il a été démontré que le VHC a développé divers moyens afin d'échapper au système immunitaire et de persister au sein de l'hôte. En effet, le VHC est capable d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺ en introduisant des mutations au niveau d'épitopes reconnus par ces lymphocytes. Ces mutations émergent surtout pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC et sont détectables majoritairement chez les patients avec une évolution chronique mais pas chez les patients guérissant spontanément (194, 247-250). Ces mutations permettent au VHC d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺, mais elles ne sont pas sans conséquences pour le virus. En effet, des mutations au niveau de protéines cruciales pour la réplication virale ont comme conséquence de réduire la capacité répliquative du VHC (251). Donc, l'introduction de mutations au niveau du génome du VHC est en partie

contrôlée par le coût métabolique du virus (*viral fitness cost*). Ce concept a été démontré par diverses études. Par exemple, une étude a observé que certaines mutations au niveau d'épitopes qui ne sont pas reconnus par les lymphocytes T correspondent plutôt à une conversion vers la séquence consensus. Ceci indique qu'en absence de pression médiée par les lymphocytes T CD8⁺, le VHC retourne à la séquence lui permettant une plus grande capacité répliquative (249). Ces études suggèrent que le VHC échappe au système immunitaire afin de promouvoir sa persistance, mais comme les mutations ne surviennent pas au niveau de tous les épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8⁺, d'autres mécanismes participent probablement à l'incapacité de ces lymphocytes à éliminer le VHC.

6.6.3 Développement de lymphocytes T dysfonctionnels

Plusieurs groupes suggèrent que la présence de lymphocytes T CD8⁺ dysfonctionnels, donc qui ont une faible production de cytokines ou une faible capacité proliférative, est un facteur déterminant dans l'évolution chronique de l'infection par le VHC (252-257). De plus, chez les patients chroniquement infectés, il a été démontré qu'une grande proportion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le VHC sont caractérisés par une forte expression du PD-1 qui est le récepteur inhibiteur de PD-L1/2 (254-256, 258, 259), et par une faible expression du CD127 qui est le récepteur de l'IL-7 (255, 258, 260). Certaines études ont même observé qu'en bloquant l'interaction du PD-1 avec ses ligands, la capacité proliférative des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le VHC est améliorée (254, 255, 258). Par contre, bloquer uniquement le PD-1 ne rétablit pas complètement la fonction des lymphocytes T CD8⁺ profondément dysfonctionnels (259). Ces observations ont poussé la recherche vers l'identification d'autres récepteurs inhibiteurs. Effectivement, l'expression de Tim-3 (261), 2B4, KLRG1 et CD160 (262) par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le VHC a également été observée chez les patients chroniquement infectés. Fait intéressant, la dysfonction des lymphocytes T CD8⁺ exprimant plusieurs récepteurs inhibiteurs n'est pas complètement rétablie lorsque seulement le PD-1 est bloqué (262). Ceci suggère que le blocage de plusieurs récepteurs inhibiteurs est probablement nécessaire pour révoquer la dysfonction des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le VHC. Les mécanismes causant la dysfonction des lymphocytes T CD8⁺ demeurent incompris, mais plusieurs facteurs y contribuent probablement, notamment la stimulation antigénique chronique, l'absence d'aide provenant des lymphocytes T CD4⁺ et la suppression par les lymphocytes T régulateurs.

6.6.4 L'absence d'aide provenant des lymphocytes T CD4⁺

Bien que les lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle central contre les infections virales, l'élimination du VHC dépend probablement aussi de l'aide provenant des lymphocytes T CD4⁺. Des études *in vivo* chez le chimpanzé ont d'ailleurs démontré que la déplétion de lymphocytes T CD4⁺ entraîne la persistance du VHC (201). Chez l'humain chroniquement infecté, il a été démontré que les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques pour le VHC sont dysfonctionnels et produisent de faibles quantités de cytokines telles que l'IL-2 (263). Cette même étude a aussi noté que les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques pour le VHC ne sont pas absents de la circulation, mais plutôt dysfonctionnels. Une étude récente est venue appuyer ces résultats en démontrant que pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC, les lymphocytes T CD4⁺ sont activés indépendamment de l'évolution de l'infection, mais qu'ils deviennent dysfonctionnels avec la persistance virale (264). Par conséquent, la perte de lymphocytes T CD4⁺ fonctionnels pourrait jouer un rôle dans le développement de lymphocytes T CD8⁺ dysfonctionnels.

6.6.5 Suppression par les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont caractérisés par l'expression du CD4, CD25 et FoxP3, et ils ont la capacité de supprimer la fonction de lymphocytes T effecteurs en sécrétant des cytokines immunosuppressives ou en entrant en contact direct avec les cellules effectrices. Plusieurs études ont démontré que la fréquence des Treg est augmentée chez les patients chroniquement infectés par le VHC en comparaison avec les patients ayant résolu spontanément (265-267). De plus, *in vitro*, les Treg ont la capacité de supprimer la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le VHC. D'autres études ont démontré que les Treg sont enrichis dans le foie de patients chroniquement infectés (268) où ils pourraient supprimer la fonction des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs afin de limiter l'immuno-pathologie médiée par ces cellules effectrices (269). Pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC, la présence de Treg fonctionnels a également été démontrée, mais elle ne corrèle pas avec l'évolution de l'infection (270, 271).

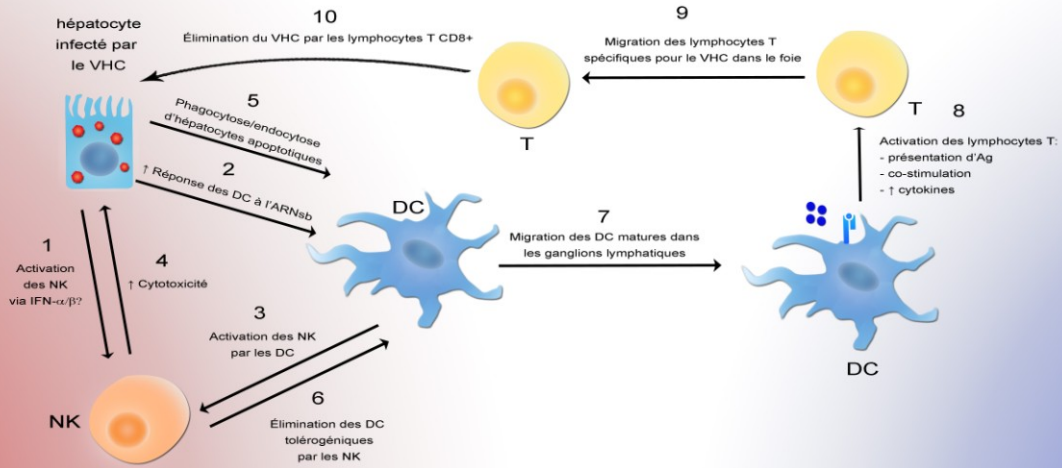
En résumé, la dysfonction des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le VHC semble influencée par plusieurs mécanismes. Cependant, d'autres études seront nécessaires afin de définir la contribution de chacun de ces mécanismes.

6.7 Modèle proposé

Les facteurs responsables de la résolution spontanée de l'infection par le VHC ne sont pas bien définis. Par contre, en se basant sur nos résultats et ceux obtenus d'autres groupes, nous proposons le modèle suivant (Figure 14). Suite à l'infection des hépatocytes par le VHC dans le foie, les hépatocytes et/ou les DC plasmacytoïdes produisent des chimiokines qui peuvent potentiellement recruter les cellules NK dans le foie, et aussi des niveaux élevés d'IFN de type I qui peuvent potentiellement activer les cellules NK. Les DC sont en mesure de reconnaître le ssRNA du VHC via les TLR7/8, mais la reconnaissance par d'autres PRR est également possible. Les DC sont alors hyperréactives au ssRNA et sécrètent des niveaux élevés de cytokines induisant l'activation des cellules NK. Les cellules NK sont activées et induisent la lyse des hépatocytes infectés. Les hépatocytes apoptotiques sont alors internalisés par les DC par phagocytose ou endocytose. Les DC immatures et tolérogéniques donc n'ayant pas rencontré de signaux de danger, sont éliminées par les cellules NK, alors que les DC matures et immunogéniques migrent vers les ganglions lymphatiques. Les DC activent les lymphocytes T naïfs en présentant des peptides dérivés du VHC, en procurant des signaux de co-stimulation et en sécrétant des niveaux élevés de cytokines. Les lymphocytes T naïfs spécifiques pour le VHC se développent en cellules effectrices et migrent vers le site d'infection où ils éliminent les hépatocytes infectés. L'infection est alors résolue spontanément.

Dans le cas d'une infection à évolution chronique, les DC sont hyperréactives au ssRNA seulement pendant la phase aiguë précoce. Suite à cette phase, les DC répondent toujours au ssRNA mais à des niveaux similaires aux contrôles non infectés. Cette diminution de production de cytokines lors d'une infection chronique ne semble pas affecter la capacité des DC à activer les cellules NK. Cependant, nous proposons que cette diminution de production de cytokines affecte la capacité des DC à générer des lymphocytes T effecteurs capables d'éliminer le VHC. Par contre, d'autres mécanismes peuvent également contribuer à l'incapacité des lymphocytes T CD8⁺ à éliminer le VHC, tels que l'apparition de mutations dans le génome du VHC lui permettant d'échapper à sa reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺, et le développement de lymphocytes T CD8⁺ dysfonctionnels causé par l'absence d'aide provenant des lymphocytes T CD4⁺ ou par la présence de signaux suppresseurs provenant des lymphocytes T régulateurs.

Résolution spontanée



Foie

Évolution chronique

Ganglions lymphatiques

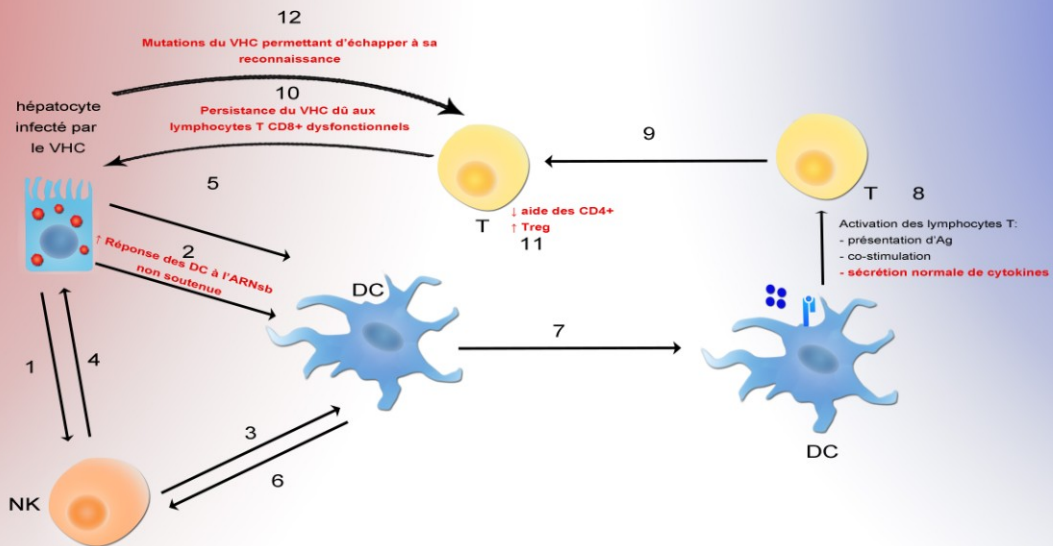


Figure 14: Modèle proposé.

Légende : Le haut de la figure représente les différentes étapes de la réponse immunitaire menant à la résolution spontanée de l'infection aiguë par le VHC. #1 : Dans le foie, les cellules NK sont possiblement activées par l'IFN de type I sécrété par les hépatocytes infectés ou par les DC plasmacytoïdes ; #2 Les DC détectent la présence du VHC via le ssRNA et sont même hyperréactives ; #3 En réponse au ssRNA les DC sécrètent diverses cytokines qui activent les cellules NK ; #4 Les cellules NK sont activées et polarisées vers la lyse des hépatocytes infectés ; #5 Les DC internalisent les hépatocytes apoptotiques par phagocytose ou endocytose ; #6 Les cellules NK lysent les DC n'ayant pas mûri correctement donc qui sont potentiellement tolérogéniques ; #7 Les DC matures migrent vers les ganglions lymphatiques ; #8 Les DC activent les lymphocytes T naïfs spécifiques pour le VHC en présentant des peptides dérivés des antigènes du VHC, en procurant des signaux de co-stimulation et en sécrétant des niveaux élevés de cytokines ; #9 Les lymphocytes T spécifiques pour le VHC migrent vers le foie ; #10 Les hépatocytes infectés sont éliminés par les CTL. Dans le cas d'une infection à évolution chronique (bas de la figure), #2 L'hyperréactivité des DC au ssRNA n'est pas soutenue ; #8 Les DC ne sécrètent plus des quantités supérieures de cytokines ce qui nuit à l'activation de lymphocytes T spécifiques pour le VHC dans les ganglions lymphatiques ; #10 Il y a persistance du VHC en raison des lymphocytes T dysfonctionnels ; #11 L'absence d'aide provenant des lymphocytes T CD4⁺ et la présence de Treg contribuent à la dysfonction des CTL ; #12 Des mutations dans le génome du VHC permettent au virus d'échapper à la reconnaissance par les CTL.

6.8 Perspectives

6.8.1 Déterminer l'impact de l'hyperréactivité des DC sur l'immunité adaptative

Dans le cadre de mon projet de doctorat, nous avons examiné les différentes interactions entre l'immunité innée et adaptative pendant la phase aiguë de l'infection par le VHC. Cependant, de nombreuses questions demeurent sans réponse. D'abord, nous avons démontré que les mDC et les pDC de patients ayant résolu spontanément sont hyperréactives au ssRNA pendant la phase aiguë et que cette hyperréactivité est même soutenue après la guérison. Par contre, l'impact direct de cette hyperréactivité demeure inconnu. Il est possible que cette hyperréactivité affecte l'activité des cellules NK et des lymphocytes T spécifique pour le VHC. En utilisant des MDDC, nous avons observé aucune différence entre les patients ayant résolu spontanément et ceux chroniquement infectés quant à la capacité des MDDC à activer les cellules NK. De plus, aucune différence n'a été observée pendant la phase aiguë. Par contre, un suivi longitudinal des patients atteints d'une infection aiguë sera crucial afin de déterminer l'évolution de l'infection et ainsi évaluer s'il y a des différences entre ces deux issues quant à la capacité des MDDC à activer les cellules NK. Par ailleurs, il est également possible que les MDDC ne représentent pas exactement les DC *ex-vivo*, donc il serait peut-être nécessaire de reproduire cet essai en utilisant des DC *ex-vivo*. Néanmoins, nos résultats suggèrent que l'hyperréactivité des DC n'influence pas le niveau d'activation des cellules NK. En perspective, il serait intéressant d'évaluer si l'hyperréactivité des DC affecte le développement de lymphocytes T effecteurs capables de contrôler l'infection par le VHC. Plus particulièrement, il serait intéressant d'évaluer s'il existe une corrélation entre l'hyperréactivité des DC et la magnitude de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T spécifiques pour le VHC. Il serait également important d'évaluer la capacité de ces DC à activer des lymphocytes T naïfs et à promouvoir leur développement en cellules effectrices.

6.8.2 Déterminer la cause de l'hyperréactivité des DC

En plus de déterminer l'impact de l'hyperréactivité des DC chez les patients ayant résolu spontanément, il serait important d'en déterminer la cause. L'hyperréactivité des DC a été préalablement démontrée dans le contexte de l'infection par le VIH-1 (272). Cette étude a aussi observé que l'hyperréactivité des DC est associée avec une augmentation de l'expression du TLR7, de l'IRF-7 et

d'autres ISG par les DC. Il serait alors intéressant d'évaluer si l'augmentation de l'expression d'ISG par les DC est également associée avec l'hyperréactivité des DC dans le contexte de la guérison spontanée de l'infection par le VHC. Le cas échéant, il serait important de déterminer les facteurs responsables de l'augmentation de l'expression des ISG et par conséquent l'hyperréactivité des DC. Ces facteurs pourraient inclure le VHC. Effectivement, il est possible que le VHC active les DC, mais qu'une stimulation chronique les inhibe de façon à ce que les DC chez les patients chroniquement infectés ne soient plus hyperréactives. Alternativement, d'autres facteurs pourraient également inclure l'activation des DC par les cellules NK. En raison du nombre limité de cellules, nous n'avons pas examiné cette interaction entre les DC et les cellules NK dans le cadre de mon projet de doctorat. Par contre, il serait important d'évaluer s'il existe une corrélation entre l'activité des DC et des cellules NK, mais également si la capacité des cellules NK à activer les DC est augmentée chez les patients ayant résolu spontanément. En résumé, il serait important de déterminer l'impact et la cause de l'hyperréactivité des DC chez les patients ayant résolu spontanément de l'infection par le VHC, mais également de déterminer si l'hyperréactivité des DC est la cause de la résolution spontanée de l'infection ou si elle est une conséquence de la résolution donc de l'élimination de la charge virale.

6.8.3 Étude des cellules NK et des DC infiltrant le foie et les organes lymphoïdes secondaires pendant la phase aiguë du VHC

Bien que l'étude des cellules NK et des DC périphériques soit informative, ces cellules en périphérie ne représentent pas nécessairement les cellules NK et les DC infiltrant le foie ou les organes lymphoïdes secondaires. Des études examinant les cellules NK infiltrant le foie pendant la phase chronique de l'infection par le VHC ont déjà été publiées. Par contre, la biopsie du foie chez les patients atteints d'une infection aiguë par le VHC n'est pas une pratique courante, ce qui rend impossible l'étude des cellules immunitaires infiltrant le foie à ce stade d'infection. Le seul modèle animal pouvant être naturellement infecté par le VHC est le chimpanzé, mais selon les nouvelles lois établies en 2011 son utilisation pour la recherche médicale est très limitée (273). Pour contourner ce problème, quelques groupes ont tenté de modifier génétiquement la souris pour en faire un modèle capable d'être infecté par le VHC. La première étude a utilisé des souris immunodéficientes, donc qui ne possèdent pas de lymphocytes T et B, mais qui ont une modification génétique causant la dégénération des hépatocytes murins. Cette étude a démontré que ces souris peuvent être greffées avec des hépatocytes humains

primaires et subséquemment infectées par le VHC (274). Ce modèle s'est avéré utile pour l'étude du cycle viral du VHC et pour des études précliniques évaluant l'efficacité de nouveaux traitements contre l'infection par le VHC. Cependant, ce modèle murin immunodéficient est inutile pour l'étude de l'immunité adaptative. Pour surmonter ce problème, deux nouveaux modèles murins ont récemment été développés. Dans ces deux modèles, les souris sont immunocompétentes, mais la réplication virale est faible donc aucune charge virale n'est détectée en périphérie. La première étude a utilisé des souris génétiquement modifiées causant la dégénération des hépatocytes murins et permettant la greffe de cellules progénitrices d'hépatocytes et de cellules souches hématopoïétiques humaines (275). Le foie de ces souris est alors repeuplé par des hépatocytes humains et le système immunitaire par des leukocytes humains. Ces souris peuvent alors être infectées par le VHC, elles développent des lymphocytes T effecteurs spécifiques pour le VHC et leur foie est infiltré par des cellules immunitaires. La deuxième étude a utilisé une approche différente qui consiste à modifier génétiquement les souris immunocompétentes de façon à ce que leurs hépatocytes expriment les récepteurs humains du VHC permettant ainsi l'infection des hépatocytes murins par le VHC (276). L'immunisation de ces souris à l'aide d'un vecteur codant pour les protéines du VHC, a stimulée le développement d'une réponse immunitaire humorale protégeant en partie les souris contre l'infection par le VHC. En résumé, ces deux nouveaux modèles murins offrent la possibilité d'examiner le système immunitaire *in vivo* pendant l'infection aiguë par le VHC. En perspective, il serait intéressant d'évaluer le phénotype et la fonction des cellules NK et des DC ayant infiltré le foie suite à l'infection. De plus, il serait important d'évaluer les interactions entre les cellules NK, les DC et les lymphocytes T non seulement au niveau du foie mais également au niveau des ganglions lymphatiques drainant le foie, afin de mieux comprendre ces interactions *in vivo* pendant l'infection aiguë par le VHC.

6.8.4 Étude des DC entrées en contact avec le VHC

Par ailleurs, le phénotype et la fonction des DC totales du sang périphérique ou des DC totales ayant infiltré le foie ne représentent pas nécessairement les DC qui sont entrées en contact avec le VHC, donc qui ont phagocyté/endocyté des hépatocytes infectés et qui présentent des antigènes du VHC aux lymphocytes T. Il serait donc intéressant d'utiliser le système de culture cellulaire du VHC afin de déterminer comment se comportent les DC mises en contact avec des hépatocytes infectés apoptotiques. Il serait alors important d'évaluer la réponse de ces DC à des stimulations avec des ligands de TLR afin

de déterminer si le contact initial des DC avec le VHC augmente ou inhibe la réponse des DC à des stimulations subséquentes. De plus, il serait intéressant de déterminer si les DC entrées en contact avec le VHC sont plus ou moins susceptibles à la lyse médiée par les cellules NK. La lyse des DC tolérogéniques par les cellules NK est importante pour prévenir le développement d'une réponse immunitaire adaptative tolérogénique, mais l'élimination des DC présentant des peptides antigéniques aux lymphocytes T pourrait nuire au développement de lymphocytes T spécifiques pour le VHC tel que démontré dans le contexte de l'infection par le MCMV chez la souris (225).

6.8.5 Établir un lien fonctionnel entre la génétique et l'évolution de l'infection par le VHC

Une autre observation qui demeure sans explication et qui mérite d'être approfondie est l'association entre la résolution spontanée de l'infection par le VHC et l'homozygotie du KIR2DL3 et de son ligand le HLA-C1 (133). En effet, nous avons essayé d'établir un lien entre le polymorphisme des KIR2DL/HLA-C et l'activité des cellules NK, mais aucun résultat concluant n'en est ressorti. Par ailleurs, une autre étude a démontré que la présence de l'allèle KIR2DS3 ou de l'allèle T de l'IL-28B (rs12979860) est associée avec la persistance du VHC, mais que la combinaison des deux allèles crée une synergie pour augmenter le risque de persistance du VHC (143). Très peu d'informations sont connues au sujet des conséquences fonctionnelles des polymorphismes de l'IL-28B associés à la persistance ou l'élimination spontanée du VHC. Certaines études ont examiné les effets de l'IL-28 sur la fonction des cellules NK, mais ces études ont en général obtenu des résultats contradictoires. Ainsi, d'autres études seront requises afin d'établir un lien fonctionnel entre l'évolution de l'infection par le VHC, l'IL-28B, son effet sur les cellules NK, ainsi que les polymorphismes des KIR et de l'IL-28B.

6.8.6 Utilisation des cellules NK dans le traitement contre le VHC

Bien que les nouveaux agents antiviraux en combinaison avec l'IFN- α et le ribavirin améliorent le taux de guérison chez les patients chroniquement infectés par le VHC, ce traitement entraîne de nombreux effets secondaires, est de longue durée et est très dispendieux. D'où l'importance de développer des traitements alternatifs. Plusieurs études cliniques ont tenté de moduler la fonction des cellules NK afin d'augmenter leur capacité à éliminer les tumeurs [révisé dans (277)]. Plusieurs stratégies ont été utilisées : 1) transfert adoptif de cellules NK alloréactives afin de provoquer un effet « greffe vs leucémie » dans le traitement contre la leucémie, 2) blocage des KIR avec des anticorps afin

d'inhiber les signaux inhibiteurs dans le traitement contre la leucémie, 3) stimulation de l'expression de TRAIL à l'aide de cytokines afin d'augmenter la capacité cytotoxique des cellules NK dans des études précliniques chez la souris, 4) activation de l'ADCC contre des lymphomes à l'aide d'anticorps spécifiques pour des antigènes tumoraux afin de stimuler la lyse des cellules tumorales par les cellules NK, 5) augmentation de l'activation, la prolifération et la survie des cellules NK à l'aide de cytokines dans le traitement contre divers cancers tels que le mélanome et le carcinome de cellules rénales. Plusieurs de ces études cliniques ne sont qu'en phase I ou II donc d'autres études seront requises pour évaluer leur efficacité dans le traitement contre le cancer.

Le rôle des cellules NK dans le contrôle d'infections virales a clairement été démontré dans plusieurs cas, notamment lors d'infections par les virus de la famille des *Herpesviridae*. Cependant, très peu d'études ont essayé de moduler la fonction des cellules NK comme stratégie de traitement contre les infections virales. Une étude récente semble toutefois prometteuse pour le traitement contre l'infection par le VHC. Ohira *et al.* (278) ont publié une étude clinique démontrant que le transfert adoptif de lymphocytes dérivés d'allogreffe du foie induit une réponse immunitaire contre le VHC suite à une transplantation du foie. Cette étude a d'abord extrait les lymphocytes d'une allogreffe du foie avant que cette dernière soit transplantée chez des patients chroniquement infectés par le VHC. Les lymphocytes extraits, composée en moyenne de cellules NK à 46% et de cellules NKT à 17%, ont été cultivés pendant trois jours en présence d'IL-2 et d'un anticorps antagoniste dirigé contre le CD3, avant d'être transférés chez les patients transplantés. Pendant le premier mois suivant la transplantation, les auteurs ont observé que la charge virale du VHC est plus faible chez les patients ayant reçu un transfert adoptif de lymphocytes (n = 7) en comparaison avec ceux n'ayant pas reçu de transfert adoptif (n = 5). De plus, la charge virale est même indétectable chez deux patients pendant quelques semaines. Chez un de ces patients, la charge virale est toujours indétectable 20 mois suivant la transplantation. Des études *ex-vivo* une semaine suivant la transplantation ont démontré que les cellules NK ont une augmentation de l'expression de TRAIL et de la capacité cytotoxique envers des cellules d'hépatomes. D'autres études *in vitro* utilisant le système de culture cellulaire du VHC ont démontré que la réplication du VHC est inhibée majoritairement par les cellules NK et NKT. De plus, cette inhibition de la réplication du VHC est dépendante de l'IFN- γ produit par les cellules NK et NKT. Finalement, le rôle du transfert adoptif de cellules NK/NKT et de l'IFN- γ dans le contrôle du VHC a été confirmé *in vivo* dans des souris

chimériques capables d'être infectées par le VHC. Par contre, le transfert adoptif de lymphocytes un mois après l'infection des souris par le VHC ne bloque pas l'évolution chronique de l'infection. En résumé, la fonction des cellules NK/NKT peut être modulée par des cytokines afin d'augmenter leur sécrétion d'IFN- γ qui possède des propriétés antivirales contre le VHC. D'autres études seront requises pour modifier le protocole thérapeutique afin d'en améliorer l'efficacité, mais également pour évaluer l'utilité de ce traitement contre l'infection primaire du VHC en absence de transplantation de foie.

6.8.7 Les besoins d'un vaccin prophylactique

Malgré le développement de nouveaux traitements contre le VHC, il existe toujours un besoin pour le développement d'un vaccin prophylactique. D'abord parce que de nombreux cas d'infections par le VHC ne sont pas diagnostiqués étant donné que l'infection demeure souvent asymptomatique pendant plusieurs années. Deuxièmement, un vaccin préventif serait très bénéfique dans les régions du monde où l'infection par le VHC est endémique. Par exemple en Egypte, il est difficile de freiner la transmission du VHC qui est endémique depuis déjà plusieurs décennies (279). Troisièmement, un vaccin prophylactique serait également crucial afin de prévenir la transmission accidentelle du VHC chez les travailleurs de la santé en milieu hospitalier. Cependant, le développement d'un vaccin représente un grand défi en raison des mutations dans le génome du VHC lui permettant d'échapper à l'immunité humorale et cellulaire. Néanmoins, deux vaccins testés chez le chimpanzé se sont avérés prometteurs et sont maintenant en phase clinique chez l'humain. Le premier vaccin consiste à immuniser des donneurs avec les protéines de l'enveloppe du VHC. Cette étude a observé que ce vaccin stimule le développement d'anticorps neutralisant capables de bloquer l'infection par d'autres virus du même génotype (280). Le deuxième vaccin consiste à immuniser des donneurs avec un vecteur codant pour des protéines non structurales du VHC et de faire un rappel avec un autre vecteur codant pour les mêmes protéines du VHC. Ce vaccin a généré une forte réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ (281). Évidemment d'autres études cliniques seront nécessaires afin d'évaluer l'efficacité de ces vaccins contre la persistance du VHC.

En conclusion, malgré les nouveaux traitements contre l'infection par le VHC, de nombreuses études seront requises afin de développer un vaccin préventif permettant d'éradiquer complètement le VHC. Étant donné que la résolution spontanée de l'infection par le VHC est associée avec une réponse

immunitaire adaptative forte et soutenue médiée par les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques pour le VHC, l'identification des facteurs modulant cette réponse adaptative serait d'une grande aide pour le développement d'un vaccin efficace. Dans le cadre de mon projet de doctorat, nous avons démontré que l'hyperréactivité des DC pourrait jouer un rôle dans l'élimination spontanée du VHC. Par contre, il sera important d'évaluer l'impact et de déterminer la cause de cette hyperréactivité. Il sera également important d'évaluer la fonction des DC ayant été en contact avec le VHC donc qui présentent des antigènes du VHC aux lymphocytes T. Finalement, les nouveaux modèles murins immunocompétents permettront d'étudier les interactions entre les cellules NK, les DC et les lymphocytes T *in vivo* au site de l'infection et dans les organes lymphoïdes secondaires.

Bibliographie

1. Shepard, C.W., Finelli, L., and Alter, M.J. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5:558-567.
2. Hoofnagle, J.H. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36:S21-29.
3. Wu, H.X., Wu, J., Wong, T., Donaldson, T., Dinner, K., Andonov, A., Ip Chan, J., Moffat, B., Baptiste, B., Furseth, J., et al. 2006. Enhanced surveillance of newly acquired hepatitis C virus infection in Canada, 1998 to 2004. *Scand J Infect Dis* 38:482-489.
4. Gravitz, L. 2011. Introduction: a smouldering public-health crisis. *Nature* 474:S2-4.
5. Dahari, H., Major, M., Zhang, X., Mihalik, K., Rice, C.M., Perelson, A.S., Feinstone, S.M., and Neumann, A.U. 2005. Mathematical modeling of primary hepatitis C infection: noncytolytic clearance and early blockage of virion production. *Gastroenterology* 128:1056-1066.
6. Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15661-15668.
7. Bigger, C.B., Brasky, K.M., and Lanford, R.E. 2001. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 75:7059-7066.
8. Su, A.I., Pezacki, J.P., Wodicka, L., Brideau, A.D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R.H., Schultz, P.G., et al. 2002. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15669-15674.
9. Rehmann, B. 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 119:1745-1754.
10. Myers, R.P., Ramji, A., Bilodeau, M., Wong, S., and Feld, J.J. 2012. An update on the management of hepatitis C: consensus guidelines from the Canadian Association for the Study of the Liver. *Can J Gastroenterol* 26:359-375.
11. Poordad, F., McCone, J., Jr., Bacon, B.R., Bruno, S., Manns, M.P., Sulkowski, M.S., Jacobson, I.M., Reddy, K.R., Goodman, Z.D., Boparai, N., et al. 2011. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 364:1195-1206.
12. Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., et al. 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 364:2405-2416.
13. Zeuzem, S., Aurora, S., Bacon, B., Box, T., Charlton, M., Diago, M. 2011. Pegylated interferon lambda (PegIFN- λ) shows superior viral response with improved safety and tolerability versus PegIFN- α -2a in HCV patients (G1/2/3/4): emerger phase IIb through week 12. *J Hepatol* 54:S538.
14. Sulkowski, M.S., Ceasu, E., Asselah, T., Caruntu, F.A., Lalezari, J., Ferenci, P. 2011. SILEN-C1: sustained virologic response (SVR) and safety of BI201335 combined with peginterferon alpha-2a and ribavirin (P/R) in treatment-naïve patients with chronic genotype 1 HCV infection. *J Hepatol* 54:S27.
15. Fried, M., Buti, M., Dore, G.J., Flisiak, R., Ferenci, P., Jacobson, I.M. 2011. TMC435 in combination with peginterferon and ribavirin in treatment-naïve HCV genotype 1 patients: final analysis of the PILLAR phase IIb study. *Hepatology* 54:1429.

16. Lok, A.S., Gardiner, D.F., Lawitz, E., Martorell, C., Everson, G.T., Ghalib, R., Reindollar, R., Rustgi, V., McPhee, F., Wind-Rotolo, M., et al. 2012. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* 366:216-224.
17. Assis, D.N., and Lim, J.K. 2012. New pharmacotherapy for hepatitis C. *Clin Pharmacol Ther* 92:294-305.
18. Flisiak, R., Pawlotsky, J.M., Crabbe, R., Calistru, P.I., Kryczka, W., Haussinger, D. 2011. Once daily alisporivir (DEB025) plus pegalpha2a/ribavirin results in superior sustained virologic response (SVR24) in chronic hepatitis C genotype 1 treatment naïve patients. *J Hepatol* 54:S2.
19. Lindenbach, B.C., Rice, C.M. 2001. Flaviviridae: The viruses and their replication. In *Fields virology*. e.a. D. Knipe, editors, editor. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 991-1041.
20. Shimizu, Y., Hishiki, T., Ujino, S., Sugiyama, K., Funami, K., and Shimotohno, K. 2011. Lipoprotein component associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Curr Opin Virol* 1:19-26.
21. Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M., and McKeating, J.A. 2004. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78:1448-1455.
22. Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21:5017-5025.
23. Evans, M.J., von Hahn, T., Tschernie, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-805.
24. Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., and Rice, C.M. 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457:882-886.
25. Mazumdar, B., Banerjee, A., Meyer, K., and Ray, R. 2011. Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. *Hepatology* 54:1149-1156.
26. Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5:453-463.
27. Doherty, D.G., and O'Farrelly, C. 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 174:5-20.
28. Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., et al. 2007. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178:4947-4955.
29. Ouyang, Q., Baerlocher, G., Vulto, I., and Lansdorp, P.M. 2007. Telomere length in human natural killer cell subsets. *Ann N Y Acad Sci* 1106:240-252.
30. Matos, M.E., Schnier, G.S., Beecher, M.S., Ashman, L.K., William, D.E., and Caligiuri, M.A. 1993. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J Exp Med* 178:1079-1084.
31. Brenchley, J.M., Karandikar, N.J., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Crotty, L.E., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Migueles, S.A., Connors, M., et al. 2003. Expression of CD57 defines

- replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* 101:2711-2720.
32. Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F., and Lanier, L.L. 2010. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16⁺ NK-cell subset. *Blood* 116:3865-3874.
 33. Lotzova, E., Savary, C.A., and Champlin, R.E. 1993. Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34⁺CD33⁻ bone marrow progenitors. *J Immunol* 150:5263-5269.
 34. Mrozek, E., Anderson, P., and Caligiuri, M.A. 1996. Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:2632-2640.
 35. Mingari, M.C., Vitale, C., Cantoni, C., Bellomo, R., Ponte, M., Schiavetti, F., Bertone, S., Moretta, A., and Moretta, L. 1997. Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 27:1374-1380.
 36. Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K., and Caligiuri, M.A. 2006. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 203:1033-1043.
 37. Alter, G., Teigen, N., Davis, B.T., Addo, M.M., Suscovich, T.J., Waring, M.T., Streeck, H., Johnston, M.N., Staller, K.D., Zaman, M.T., et al. 2005. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 106:3366-3369.
 38. Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., et al. 2005. Characterization of CD56⁺/CD16⁺ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2886-2891.
 39. Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., and Trowsdale, J. 2000. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4778-4783.
 40. Uhrberg, M., Parham, P., and Wernet, P. 2002. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 54:221-229.
 41. Marsh, S.G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D.E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L.A., et al. 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics* 55:220-226.
 42. Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Parham, P. 1997. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7:739-751.
 43. Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaourier, M.J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., and Braud, V.M. 2005. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol* 175:7791-7795.
 44. Rosen, D.B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P.A., Warren, H.S., and Lanier, L.L. 2005. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J Immunol* 175:7796-7799.
 45. Gonzalez, S., Groh, V., and Spies, T. 2006. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 298:121-138.

46. Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., et al. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6:515-523.
47. Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., et al. 2007. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27:965-974.
48. Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., et al. 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 206:1495-1503.
49. Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055-1060.
50. Hershkovitz, O., Rosental, B., Rosenberg, L.A., Navarro-Sanchez, M.E., Jivov, S., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Brient-Litzler, E., Bedouelle, H., Ho, J.W., et al. 2009. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol* 183:2610-2621.
51. Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. 2001. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31:2680-2689.
52. Byrd, A., Hoffmann, S.C., Jarahian, M., Momburg, F., and Watzl, C. 2007. Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. *PLoS One* 2:e1339.
53. Rajagopalan, S., and Long, E.O. 2012. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front Immunol* 3:258.
54. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9:503-510.
55. Maher, S.G., Romero-Weaver, A.L., Scarzello, A.J., and Gamero, A.M. 2007. Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem* 14:1279-1289.
56. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.
57. De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C., and Moretta, L. 2011. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:728-732.
58. Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.G., and Bryceson, Y.T. 2010. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115:2167-2176.
59. Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214:73-91.
60. Ljunggren, H.G., and Karre, K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-244.
61. Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., et al. 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436:709-713.
62. Gasser, S., and Raulet, D.H. 2006. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 214:130-142.
63. Lodoen, M.B., and Lanier, L.L. 2005. Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol* 3:59-69.

64. Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5:919-923.
65. Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.
66. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74-80.
67. Janeway, C.A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1:1-13.
68. Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
69. Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045.
70. Joffre, O., Nolte, M.A., Sporri, R., and Reis e Sousa, C. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227:234-247.
71. Steinman, R.M. 2003. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 111:675-697.
72. Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
73. Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.
74. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677-704.
75. Heath, W.R., and Carbone, F.R. 2009. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 10:1237-1244.
76. Raulat, D.H. 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 5:996-1002.
77. Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., and Munz, C. 2004. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16606-16611.
78. Garrod, K.R., Wei, S.H., Parker, I., and Cahalan, M.D. 2007. Natural killer cells actively patrol peripheral lymph nodes forming stable conjugates to eliminate MHC-mismatched targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12081-12086.
79. Bajenoff, M., Breart, B., Huang, A.Y., Qi, H., Cazareth, J., Braud, V.M., Germain, R.N., and Glaichenhaus, N. 2006. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 203:619-631.
80. Beuneu, H., Deguine, J., Breart, B., Mandelboim, O., Di Santo, J.P., and Bousso, P. 2009. Dynamic behavior of NK cells during activation in lymph nodes. *Blood* 114:3227-3234.

81. Walzer, T., Blery, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S.H., Jaeger, S., Andre, P., Gauthier, L., Daniel, L., et al. 2007. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3384-3389.
82. Campbell, J.J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K.E., Hodge, M.R., Wu, L., and Butcher, E.C. 2001. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 166:6477-6482.
83. Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M.A. 2003. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101:3052-3057.
84. Chen, S., Kawashima, H., Lowe, J.B., Lanier, L.L., and Fukuda, M. 2005. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med* 202:1679-1689.
85. Kim, C.H., Pelus, L.M., Appelbaum, E., Johanson, K., Anzai, N., and Broxmeyer, H.E. 1999. CCR7 ligands, SLC/6CKine/Exodus2/TCA4 and CKbeta-11/MIP-3beta/ELC, are chemoattractants for CD56(+)CD16(-) NK cells and late stage lymphoid progenitors. *Cell Immunol* 193:226-235.
86. Frey, M., Packianathan, N.B., Fehniger, T.A., Ross, M.E., Wang, W.C., Stewart, C.C., Caligiuri, M.A., and Evans, S.S. 1998. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 161:400-408.
87. Alvarez, D., Vollmann, E.H., and von Andrian, U.H. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29:325-342.
88. Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188:373-386.
89. Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28:2760-2769.
90. Sozzani, S., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Zhou, D., Piemonti, L., D'Amico, G., Power, C.A., Wells, T.N., Gobbi, M., et al. 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 159:1993-2000.
91. Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640-644.
92. Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327-333.
93. Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195:335-341.
94. Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Arico, M., Moretta, L., and Moretta, A. 2005. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106:566-571.

95. Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Munz, C. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195:343-351.
96. Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Dondero, A., Lazzeri, E., Lasagni, L., Martini, S., Rivera, P., et al. 2006. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107:2030-2036.
97. Spaggiari, G.M., Carosio, R., Pende, D., Marcenaro, S., Rivera, P., Zocchi, M.R., Moretta, L., and Poggi, A. 2001. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol* 31:1656-1665.
98. Hayakawa, Y., Screpanti, V., Yagita, H., Grandien, A., Ljunggren, H.G., Smyth, M.J., and Chambers, B.J. 2004. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* 172:123-129.
99. Melki, M.T., Saidi, H., Dufour, A., Olivo-Marin, J.C., and Gougeon, M.L. 2010. Escape of HIV-1-infected dendritic cells from TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity during NK-DC cross-talk--a pivotal role of HMGB1. *PLoS Pathog* 6:e1000862.
100. Laffont, S., Seillet, C., Ortaldo, J., Coudert, J.D., and Guery, J.C. 2008. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood* 112:661-671.
101. Fernandez, N.C., Flament, C., Crepineau, F., Angevin, E., Vivier, E., and Zitvogel, L. 2002. Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk. *Eur Cytokine Netw* 13:17-27.
102. Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G. 2005. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174:727-734.
103. Nguyen, K.B., Salazar-Mather, T.P., Dalod, M.Y., Van Deusen, J.B., Wei, X.Q., Liew, F.Y., Caligiuri, M.A., Durbin, J.E., and Biron, C.A. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 169:4279-4287.
104. Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., Ryffel, B., Cambi, A., Figdor, C., Vainchenker, W., et al. 2004. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104:3267-3275.
105. Semino, C., Angelini, G., Poggi, A., and Rubartelli, A. 2005. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106:609-616.
106. Brilot, F., Strowig, T., Roberts, S.M., Arrey, F., and Munz, C. 2007. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15 α . *J Clin Invest* 117:3316-3329.
107. Huntington, N.D., Puthalakath, H., Gunn, P., Naik, E., Michalak, E.M., Smyth, M.J., Tabarias, H., Degli-Esposti, M.A., Dewson, G., Willis, S.N., et al. 2007. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol* 8:856-863.
108. Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Sasaki, Y., and Hayashi, N. 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression

- on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170:1249-1256.
109. Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W.J., Beer-Stolz, D., and Vujanovic, N.L. 2012. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 1:1074-1083.
 110. Barreira da Silva, R., and Munz, C. 2011. Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. *Cell Mol Life Sci* 68:3505-3518.
 111. Barreira da Silva, R., Graf, C., and Munz, C. 2011. Cytoskeletal stabilization of inhibitory interactions in immunologic synapses of mature human dendritic cells with natural killer cells. *Blood* 118:6487-6498.
 112. Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30:646-655.
 113. Tan, C., and Gery, I. 2012. The unique features of Th9 cells and their products. *Crit Rev Immunol* 32:1-10.
 114. Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. 2012. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 209:1241-1253.
 115. Diebold, S.S. 2008. Determination of T-cell fate by dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 86:389-397.
 116. Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320:1731-1735.
 117. Gazit, R., Garty, B.Z., Monselise, Y., Hoffer, V., Finkelstein, Y., Markel, G., Katz, G., Hanna, J., Achdout, H., Gruda, R., et al. 2004. Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood* 103:1965-1966.
 118. Pyzik, M., Gendron-Pontbriand, E.M., and Vidal, S.M. 2011. The impact of Ly49-NK cell-dependent recognition of MCMV infection on innate and adaptive immune responses. *J Biomed Biotechnol* 2011:641702.
 119. Bubic, I., Wagner, M., Krmpotic, A., Saulig, T., Kim, S., Yokoyama, W.M., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. 2004. Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J Virol* 78:7536-7544.
 120. Sjolín, H., Tomasello, E., Mousavi-Jazi, M., Bartolazzi, A., Karre, K., Vivier, E., and Cerboni, C. 2002. Pivotal role of KARAP/DAP12 adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 195:825-834.
 121. Cheng, T.P., French, A.R., Plougastel, B.F., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Buller, M.L., and Yokoyama, W.M. 2008. Ly49h is necessary for genetic resistance to murine cytomegalovirus. *Immunogenetics* 60:565-573.
 122. Fodil-Cornu, N., Lee, S.H., Belanger, S., Makrigiannis, A.P., Biron, C.A., Buller, R.M., and Vidal, S.M. 2008. Ly49h-deficient C57BL/6 mice: a new mouse cytomegalovirus-susceptible model remains resistant to unrelated pathogens controlled by the NK gene complex. *J Immunol* 181:6394-6405.
 123. Lee, S.H., Zafer, A., de Repentigny, Y., Kothary, R., Tremblay, M.L., Gros, P., Duplay, P., Webb, J.R., and Vidal, S.M. 2003. Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice. *J Exp Med* 197:515-526.

124. Kottlilil, S., Chun, T.W., Moir, S., Liu, S., McLaughlin, M., Hallahan, C.W., Maldarelli, F., Corey, L., and Fauci, A.S. 2003. Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. *J Infect Dis* 187:1038-1045.
125. Portales, P., Reynes, J., Pinet, V., Rouzier-Panis, R., Baillat, V., Clot, J., and Corbeau, P. 2003. Interferon-alpha restores HIV-induced alteration of natural killer cell perforin expression in vivo. *AIDS* 17:495-504.
126. De Maria, A., Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Puppo, F., Mavilio, D., Moretta, A., and Moretta, L. 2003. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur J Immunol* 33:2410-2418.
127. Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Setti, M., Mingari, M.C., Moretta, L., Moretta, A., and De Maria, A. 2004. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur J Immunol* 34:2313-2321.
128. Mavilio, D., Lombardo, G., Kinter, A., Fogli, M., La Sala, A., Ortolano, S., Farschi, A., Follmann, D., Gregg, R., Kovacs, C., et al. 2006. Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *J Exp Med* 203:2339-2350.
129. Tasca, S., Tambussi, G., Nozza, S., Capiluppi, B., Zocchi, M.R., Soldini, L., Veglia, F., Poli, G., Lazzarin, A., and Fortis, C. 2003. Escape of monocyte-derived dendritic cells of HIV-1 infected individuals from natural killer cell-mediated lysis. *AIDS* 17:2291-2298.
130. Alter, G., Kavanagh, D., Rihn, S., Luteijn, R., Brooks, D., Oldstone, M., van Lunzen, J., and Altfeld, M. 2010. IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *J Clin Invest* 120:1905-1913.
131. Tjwa, E.T., van Oord, G.W., Biesta, P.J., Boonstra, A., Janssen, H.L., and Woltman, A.M. 2012. Restoration of TLR3-activated myeloid dendritic cell activity leads to improved natural killer cell function in chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 86:4102-4109.
132. Okazaki, A., Hiraga, N., Imamura, M., Hayes, C.N., Tsuge, M., Takahashi, S., Aikata, H., Abe, H., Miki, D., Ochi, H., et al. 2012. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology* 56:555-566.
133. Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., et al. 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305:872-874.
134. Romero, V., Azocar, J., Zuniga, J., Clavijo, O.P., Terreros, D., Gu, X., Husain, Z., Chung, R.T., Amos, C., and Yunis, E.J. 2008. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol* 45:2429-2436.
135. Zuniga, J., Romero, V., Azocar, J., Terreros, D., Vargas-Rojas, M.I., Torres-Garcia, D., Jimenez-Alvarez, L., Vargas-Alarcon, G., Granados-Montiel, J., Husain, Z., et al. 2009. Protective KIR-HLA interactions for HCV infection in intravenous drug users. *Mol Immunol* 46:2723-2727.
136. Knapp, S., Warshow, U., Hegazy, D., Brackenbury, L., Guha, I.N., Fowell, A., Little, A.M., Alexander, G.J., Rosenberg, W.M., Cramp, M.E., et al. 2010. Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* 51:1168-1175.
137. Vidal-Castineira, J.R., Lopez-Vazquez, A., Diaz-Pena, R., Alonso-Arias, R., Martinez-Borra, J., Perez, R., Fernandez-Suarez, J., Melon, S., Prieto, J., Rodrigo, L., et al. 2010. Effect of killer

- immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 84:475-481.
138. Moesta, A.K., Norman, P.J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., and Parham, P. 2008. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 180:3969-3979.
 139. Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., et al. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798-801.
 140. Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., et al. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399-401.
 141. Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K., Hige, S., et al. 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105-1109.
 142. Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M.L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G.J., Powell, E., et al. 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41:1100-1104.
 143. Dring, M.M., Morrison, M.H., McSharry, B.P., Guinan, K.J., Hagan, R., Irish, H.C.V.R.C., O'Farrelly, C., and Gardiner, C.M. 2011. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5736-5741.
 144. Parham, P. 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 5:201-214.
 145. Horner, S.M., and Gale, M., Jr. 2009. Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus. *J Interferon Cytokine Res* 29:489-498.
 146. Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., et al. 2002. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 195:35-41.
 147. Tseng, C.T., and Klimpel, G.R. 2002. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 195:43-49.
 148. Crotta, S., Brazzoli, M., Piccioli, D., Valiante, N.M., and Wack, A. 2010. Hepatitis C virions subvert natural killer cell activation to generate a cytokine environment permissive for infection. *J Hepatol* 52:183-190.
 149. Yoon, J.C., Shiina, M., Ahlenstiel, G., and Rehermann, B. 2009. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* 49:12-21.
 150. Sene, D., Levasseur, F., Abel, M., Lambert, M., Camous, X., Hernandez, C., Pene, V., Rosenberg, A.R., Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., et al. 2010. Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. *PLoS Pathog* 6:e1001184.
 151. Yoon, J.C., Lim, J.B., Park, J.H., and Lee, J.M. 2011. Cell-to-cell contact with hepatitis C virus-infected cells reduces functional capacity of natural killer cells. *J Virol* 85:12557-12569.
 152. Larkin, J., Bost, A., Glass, J.I., and Tan, S.L. 2006. Cytokine-activated natural killer cells exert direct killing of hepatoma cells harboring hepatitis C virus replicons. *J Interferon Cytokine Res* 26:854-865.

153. Stegmann, K.A., Bjorkstrom, N.K., Veber, H., Ciesek, S., Riese, P., Wiegand, J., Hadem, J., Suneetha, P.V., Jaroszewicz, J., Wang, C., et al. 2010. Interferon-alpha-induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138:1885-1897.
154. Wang, S.H., Huang, C.X., Ye, L., Wang, X., Song, L., Wang, Y.J., Liang, H., Huang, X.Y., and Ho, W.Z. 2008. Natural killer cells suppress full cycle HCV infection of human hepatocytes. *J Viral Hepat* 15:855-864.
155. Morishima, C., Paschal, D.M., Wang, C.C., Yoshihara, C.S., Wood, B.L., Yeo, A.E., Emerson, S.S., Shuhart, M.C., and Gretch, D.R. 2006. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 43:573-580.
156. Bonorino, P., Ramzan, M., Camous, X., Dufeu-Duchesne, T., Thelu, M.A., Sturm, N., Dariz, A., Guillermet, C., Pernollet, M., Zarski, J.P., et al. 2009. Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatol* 51:458-467.
157. Golden-Mason, L., Madrigal-Estebas, L., McGrath, E., Conroy, M.J., Ryan, E.J., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., and Doherty, D.G. 2008. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 57:1121-1128.
158. De Maria, A., Fogli, M., Mazza, S., Basso, M., Picciotto, A., Costa, P., Congia, S., Mingari, M.C., and Moretta, L. 2007. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol* 37:445-455.
159. Lin, A.W., Gonzalez, S.A., Cunningham-Rundles, S., Dorante, G., Marshall, S., Tignor, A., Ha, C., Jacobson, I.M., and Talal, A.H. 2004. CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 137:408-416.
160. Gonzalez, V.D., Falconer, K., Bjorkstrom, N.K., Blom, K.G., Weiland, O., Ljunggren, H.G., Alaeus, A., and Sandberg, J.K. 2009. Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment. *J Immunol* 183:6612-6618.
161. Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Kanazawa, Y., Hiramatsu, N., and Hayashi, N. 2004. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173:6072-6081.
162. Nattermann, J., Nischalke, H.D., Hofmeister, V., Ahlenstiel, G., Zimmermann, H., Leifeld, L., Weiss, E.H., Sauerbruch, T., and Spengler, U. 2005. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 166:443-453.
163. Nattermann, J., Feldmann, G., Ahlenstiel, G., Langhans, B., Sauerbruch, T., and Spengler, U. 2006. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 55:869-877.
164. Cheent, K., and Khakoo, S.I. 2011. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* 60:268-278.
165. Oliviero, B., Varchetta, S., Paudice, E., Michelone, G., Zaramella, M., Mavilio, D., De Filippi, F., Bruno, S., and Mondelli, M.U. 2009. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 137:1151-1160, 1160 e1151-1157.

166. Ahlenstiel, G., Titerence, R.H., Koh, C., Edlich, B., Feld, J.J., Rotman, Y., Ghany, M.G., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Heller, T., et al. 2010. Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology* 138:325-335 e321-322.
167. Duesberg, U., Schneiders, A.M., Flieger, D., Inchauspe, G., Sauerbruch, T., and Spengler, U. 2001. Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C. *J Hepatol* 35:650-657.
168. Dessouki, O., Kamiya, Y., Nagahama, H., Tanaka, M., Suzu, S., Sasaki, Y., and Okada, S. 2010. Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 393:331-337.
169. Jo, J., Aichele, U., Kersting, N., Klein, R., Aichele, P., Bisse, E., Sewell, A.K., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Lohmann, V., et al. 2009. Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology* 136:1391-1401.
170. Auffermann-Gretzinger, S., Keeffe, E.B., and Levy, S. 2001. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 97:3171-3176.
171. Dolganiuc, A., Paek, E., Kodys, K., Thomas, J., and Szabo, G. 2008. Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes. *Gastroenterology* 135:2119-2127.
172. Longman, R.S., Talal, A.H., Jacobson, I.M., Albert, M.L., and Rice, C.M. 2004. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 103:1026-1029.
173. Bain, C., Fatmi, A., Zoulim, F., Zarski, J.P., Trepo, C., and Inchauspe, G. 2001. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 120:512-524.
174. Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Tatsumi, T., Kuzushita, N., Ito, A., Sasaki, Y., Kasahara, A., and Hori, M. 1999. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 162:5584-5591.
175. Anthony, D.D., Yonkers, N.L., Post, A.B., Asaad, R., Heinzl, F.P., Lederman, M.M., Lehmann, P.V., and Valdez, H. 2004. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol* 172:4907-4916.
176. Goutagny, N., Vieux, C., Decullier, E., Ligeoix, B., Epstein, A., Trepo, C., Couzigou, P., Inchauspe, G., and Bain, C. 2004. Quantification and functional analysis of plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 189:1646-1655.
177. Murakami, H., Akbar, S.M., Matsui, H., Horiike, N., and Onji, M. 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.
178. Kanto, T., Inoue, M., Miyatake, H., Sato, A., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Oki, C., Itose, I., Hiramatsu, N., Takehara, T., et al. 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.
179. Kanto, T., Inoue, M., Miyazaki, M., Itose, I., Miyatake, H., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Kaimori, A., Oki, C., Hiramatsu, N., et al. 2006. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology* 49:58-63.

180. Longman, R.S., Talal, A.H., Jacobson, I.M., Rice, C.M., and Albert, M.L. 2005. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 192:497-503.
181. Della Bella, S., Crosignani, A., Riva, A., Presicce, P., Benetti, A., Longhi, R., Podda, M., and Villa, M.L. 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.
182. Averill, L., Lee, W.M., and Karandikar, N.J. 2007. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection. *Clin Immunol* 123:40-49.
183. Piccioli, D., Tavarini, S., Nuti, S., Colombatto, P., Brunetto, M., Bonino, F., Ciccorossi, P., Zorat, F., Pozzato, G., Comar, C., et al. 2005. Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors. *J Hepatol* 42:61-67.
184. Ryan, E.J., and O'Farrelly, C. 2011. The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence. *J Viral Hepat* 18:601-607.
185. Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Suzuki, T., Miyagi, T., and Hayashi, N. 2003. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 171:5423-5429.
186. Conry, S.J., Milkovich, K.A., Yonkers, N.L., Rodriguez, B., Bernstein, H.B., Asaad, R., Heinzl, F.P., Tary-Lehmann, M., Lederman, M.M., and Anthony, D.D. 2009. Impaired plasmacytoid dendritic cell (PDC)-NK cell activity in viremic human immunodeficiency virus infection attributable to impairments in both PDC and NK cell function. *J Virol* 83:11175-11187.
187. Diepolder, H.M., Zachoval, R., Hoffmann, R.M., Wierenga, E.A., Santantonio, T., Jung, M.C., Eichenlaub, D., and Pape, G.R. 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346:1006-1007.
188. Diepolder, H.M., Gerlach, J.T., Zachoval, R., Hoffmann, R.M., Jung, M.C., Wierenga, E.A., Scholz, S., Santantonio, T., Houghton, M., Southwood, S., et al. 1997. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 71:6011-6019.
189. Missale, G., Bertoni, R., Lamonaca, V., Valli, A., Massari, M., Mori, C., Rumi, M.G., Houghton, M., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. 1996. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 98:706-714.
190. Cooper, S., Erickson, A.L., Adams, E.J., Kansopon, J., Weiner, A.J., Chien, D.Y., Houghton, M., Parham, P., and Walker, C.M. 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10:439-449.
191. Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B.D. 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191:1499-1512.
192. Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C., and Chisari, F.V. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194:1395-1406.

193. Day, C.L., Lauer, G.M., Robbins, G.K., McGovern, B., Wurcel, A.G., Gandhi, R.T., Chung, R.T., and Walker, B.D. 2002. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 76:12584-12595.
194. Cox, A.L., Mosbrugger, T., Lauer, G.M., Pardoll, D., Thomas, D.L., and Ray, S.C. 2005. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* 42:104-112.
195. Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J.L., Manns, M.P., and Rehermann, B. 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6:578-582.
196. Bowen, D.G., and Walker, C.M. 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436:946-952.
197. Gruner, N.H., Gerlach, T.J., Jung, M.C., Diepolder, H.M., Schirren, C.A., Schraut, W.W., Hoffmann, R., Zachoval, R., Santantonio, T., Cucchiaroni, M., et al. 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 181:1528-1536.
198. Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197:1645-1655.
199. Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Jung, M.C., Gruener, N.H., Schraut, W.W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C.A., Santantonio, T., and Pape, G.R. 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117:933-941.
200. Schulze zur Wiesch, J., Lauer, G.M., Day, C.L., Kim, A.Y., Ouchi, K., Duncan, J.E., Wurcel, A.G., Timm, J., Jones, A.M., Mothe, B., et al. 2005. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 175:3603-3613.
201. Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., and Walker, C.M. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302:659-662.
202. Thimme, R., Binder, M., and Bartenschlager, R. 2012. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol Rev* 36:663-683.
203. Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.C., Granier, C., Engle, R.E., Blackwelder, W.C., Emerson, S.U., Cosset, F.L., and Purcell, R.H. 2003. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14199-14204.
204. Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M., and McKeating, J.A. 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10149-10154.
205. Netski, D.M., Mosbrugger, T., Depla, E., Maertens, G., Ray, S.C., Hamilton, R.G., Roundtree, S., Thomas, D.L., McKeating, J., and Cox, A. 2005. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 41:667-675.
206. Kaplan, D.E., Sugimoto, K., Newton, K., Valiga, M.E., Ikeda, F., Aytaman, A., Nunes, F.A., Lucey, M.R., Vance, B.A., Vonderheide, R.H., et al. 2007. Discordant role of CD4 T-cell

- response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 132:654-666.
207. Zeisel, M.B., Cosset, F.L., and Baumert, T.F. 2008. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 48:299-307.
 208. Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., et al. 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6025-6030.
 209. Osburn, W.O., Fisher, B.E., Dowd, K.A., Urban, G., Liu, L., Ray, S.C., Thomas, D.L., and Cox, A.L. 2010. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 138:315-324.
 210. Lauer, G.M., Ouchi, K., Chung, R.T., Nguyen, T.N., Day, C.L., Purkis, D.R., Reiser, M., Kim, A.Y., Lucas, M., Klenerman, P., et al. 2002. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 76:6104-6113.
 211. Neumann-Haefelin, C., Timm, J., Spangenberg, H.C., Wischniowski, N., Nazarova, N., Kersting, N., Roggendorf, M., Allen, T.M., Blum, H.E., and Thimme, R. 2008. Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8+ T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 47:1824-1836.
 212. Amadei, B., Urbani, S., Cazaly, A., Fiscaro, P., Zerbini, A., Ahmed, P., Missale, G., Ferrari, C., and Khakoo, S.I. 2010. Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 138:1536-1545.
 213. Alter, G., Jost, S., Rihn, S., Reyor, L.L., Nolan, B.E., Ghebremichael, M., Bosch, R., Altfeld, M., and Lauer, G.M. 2011. Reduced frequencies of NKp30+ NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol* 55:278-288.
 214. Golden-Mason, L., Cox, A.L., Randall, J.A., Cheng, L., and Rosen, H.R. 2010. Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology* 52:1581-1589.
 215. Wen, C., He, X., Ma, H., Hou, N., Wei, C., Song, T., Zhang, Y., Sun, L., Ma, Q., and Zhong, H. 2008. Hepatitis C virus infection downregulates the ligands of the activating receptor NKG2D. *Cell Mol Immunol* 5:475-478.
 216. Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premisri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., et al. 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361:2209-2220.
 217. Karnasuta, C., Paris, R.M., Cox, J.H., Nitayaphan, S., Pitisuttithum, P., Thongcharoen, P., Brown, A.E., Gurunathan, S., Tartaglia, J., Heyward, W.L., et al. 2005. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxic responses in participants enrolled in a phase I/II ALVAC-HIV/AIDSVAX B/E prime-boost HIV-1 vaccine trial in Thailand. *Vaccine* 23:2522-2529.
 218. Forthal, D.N., and Moog, C. 2009. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS* 4:388-393.
 219. Forthal, D.N., Landucci, G., and Daar, E.S. 2001. Antibody from patients with acute human immunodeficiency virus (HIV) infection inhibits primary strains of HIV type 1 in the presence of natural-killer effector cells. *J Virol* 75:6953-6961.
 220. Lambotte, O., Ferrari, G., Moog, C., Yates, N.L., Liao, H.X., Parks, R.J., Hicks, C.B., Owzar, K., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C., et al. 2009. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 23:897-906.

221. Novick, D.M., Ochshorn, M., Ghali, V., Croxson, T.S., Mercer, W.D., Chiorazzi, N., and Kreek, M.J. 1989. Natural killer cell activity and lymphocyte subsets in parenteral heroin abusers and long-term methadone maintenance patients. *J Pharmacol Exp Ther* 250:606-610.
222. Vallejo, R., de Leon-Casasola, O., and Benyamin, R. 2004. Opioid therapy and immunosuppression: a review. *Am J Ther* 11:354-365.
223. Morandi, B., Bougras, G., Muller, W.A., Ferlazzo, G., and Munz, C. 2006. NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *Eur J Immunol* 36:2394-2400.
224. Waggoner, S.N., Cornberg, M., Selin, L.K., and Welsh, R.M. 2012. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* 481:394-398.
225. Andrews, D.M., Estcourt, M.J., Andoniou, C.E., Wikstrom, M.E., Khong, A., Voigt, V., Fleming, P., Tabarias, H., Hill, G.R., van der Most, R.G., et al. 2010. Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med* 207:1333-1343.
226. Dolganiuc, A., and Szabo, G. 2011. Dendritic cells in hepatitis C infection: can they (help) win the battle? *J Gastroenterol* 46:432-447.
227. Liang, H., Russell, R.S., Yonkers, N.L., McDonald, D., Rodriguez, B., Harding, C.V., and Anthony, D.D. 2009. Differential effects of hepatitis C virus JFH1 on human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 83:5693-5707.
228. Shiina, M., and Rehermann, B. 2008. Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function. *Hepatology* 47:385-395.
229. Navas, M.C., Fuchs, A., Schvoerer, E., Bohbot, A., Aubertin, A.M., and Stoll-Keller, F. 2002. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol* 67:152-161.
230. Pham, T.N., MacParland, S.A., Mulrooney, P.M., Cooksley, H., Naoumov, N.V., and Michalak, T.I. 2004. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol* 78:5867-5874.
231. Goutagny, N., Fatmi, A., De Ledinghen, V., Penin, F., Couzigou, P., Inchauspe, G., and Bain, C. 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 187:1951-1958.
232. Ludwig, I.S., Lekkerkerker, A.N., Depla, E., Bosman, F., Musters, R.J., Depraetere, S., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. 2004. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *J Virol* 78:8322-8332.
233. Cormier, E.G., Durso, R.J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W.C., Gardner, J.P., and Dragic, T. 2004. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14067-14072.
234. Ebihara, T., Shingai, M., Matsumoto, M., Wakita, T., and Seya, T. 2008. Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology* 48:48-58.
235. Kato, N. 2001. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 55:133-159.
236. Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., et al. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626.
237. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., et al. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796.

238. Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9294-9299.
239. Racanelli, V., and Rehermann, B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43:S54-62.
240. Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P.A., Modlin, R.L., Liblau, R.S., Gressner, A.M., and Kaufmann, S.H. 2007. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26:117-129.
241. Bertolino, P., Trescol-Biemont, M.C., and Rouboudin-Combe, C. 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* 28:221-236.
242. Bertolino, P., Trescol-Biemont, M.C., Thomas, J., Fazekas de St Groth, B., Pihlgren, M., Marvel, J., and Rouboudin-Combe, C. 1999. Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int Immunol* 11:1225-1238.
243. Bertolino, P., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Fazekas de St Groth, B. 2001. Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J Immunol* 166:5430-5438.
244. Bowen, D.G., Zen, M., Holz, L., Davis, T., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. 2004. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 114:701-712.
245. Holz, L.E., Benseker, V., Bowen, D.G., Bouillet, P., Strasser, A., O'Reilly, L., d'Avigdor, W.M., Bishop, A.G., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. 2008. Intrahepatic murine CD8 T-cell activation associates with a distinct phenotype leading to Bim-dependent death. *Gastroenterology* 135:989-997.
246. Holz, L.E., Warren, A., Le Couteur, D.G., Bowen, D.G., and Bertolino, P. 2010. CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes. *J Autoimmun* 34:15-22.
247. Erickson, A.L., Kimura, Y., Igarashi, S., Eichelberger, J., Houghton, M., Sidney, J., McKinney, D., Sette, A., Hughes, A.L., and Walker, C.M. 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15:883-895.
248. Timm, J., Lauer, G.M., Kavanagh, D.G., Sheridan, I., Kim, A.Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L.L., Schulze zur Wiesch, J., et al. 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200:1593-1604.
249. Cox, A.L., Mosbrugger, T., Mao, Q., Liu, Z., Wang, X.H., Yang, H.C., Sidney, J., Sette, A., Pardoll, D., Thomas, D.L., et al. 2005. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 201:1741-1752.
250. Tester, I., Smyk-Pearson, S., Wang, P., Wertheimer, A., Yao, E., Lewinsohn, D.M., Tavis, J.E., and Rosen, H.R. 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med* 201:1725-1731.
251. Bowen, D.G., and Walker, C.M. 2005. Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J Exp Med* 201:1709-1714.
252. Wedemeyer, H., He, X.S., Nascimbeni, M., Davis, A.R., Greenberg, H.B., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Alter, H., and Rehermann, B. 2002. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 169:3447-3458.

253. Spangenberg, H.C., Viazov, S., Kersting, N., Neumann-Haefelin, C., McKinney, D., Roggendorf, M., von Weizsacker, F., Blum, H.E., and Thimme, R. 2005. Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 42:828-837.
254. Penna, A., Pilli, M., Zerbini, A., Orlandini, A., Mezzadri, S., Sacchelli, L., Missale, G., and Ferrari, C. 2007. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 45:588-601.
255. Radziewicz, H., Ibegbu, C.C., Fernandez, M.L., Workowski, K.A., Obideen, K., Wehbi, M., Hanson, H.L., Steinberg, J.P., Masopust, D., Wherry, E.J., et al. 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. *J Virol* 81:2545-2553.
256. Radziewicz, H., Ibegbu, C.C., Hon, H., Osborn, M.K., Obideen, K., Wehbi, M., Freeman, G.J., Lennox, J.L., Workowski, K.A., Hanson, H.L., et al. 2008. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol* 82:9808-9822.
257. Nakamoto, N., Cho, H., Shaked, A., Olthoff, K., Valiga, M.E., Kaminski, M., Gostick, E., Price, D.A., Freeman, G.J., Wherry, E.J., et al. 2009. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 5:e1000313.
258. Golden-Mason, L., Palmer, B., Klarquist, J., Mengshol, J.A., Castelblanco, N., and Rosen, H.R. 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 81:9249-9258.
259. Nakamoto, N., Kaplan, D.E., Coleclough, J., Li, Y., Valiga, M.E., Kaminski, M., Shaked, A., Olthoff, K., Gostick, E., Price, D.A., et al. 2008. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 134:1927-1937, 1937 e1921-1922.
260. Bengsch, B., Spangenberg, H.C., Kersting, N., Neumann-Haefelin, C., Panther, E., von Weizsacker, F., Blum, H.E., Pircher, H., and Thimme, R. 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. *J Virol* 81:945-953.
261. Golden-Mason, L., Palmer, B.E., Kassam, N., Townshend-Bulson, L., Livingston, S., McMahon, B.J., Castelblanco, N., Kuchroo, V., Gretch, D.R., and Rosen, H.R. 2009. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol* 83:9122-9130.
262. Bengsch, B., Seigel, B., Ruhl, M., Timm, J., Kuntz, M., Blum, H.E., Pircher, H., and Thimme, R. 2010. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog* 6:e1000947.
263. Semmo, N., Day, C.L., Ward, S.M., Lucas, M., Harcourt, G., Loughry, A., and Klenerman, P. 2005. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 41:1019-1028.
264. Schulze Zur Wiesch, J., Ciuffreda, D., Lewis-Ximenez, L., Kasprovicz, V., Nolan, B.E., Streeck, H., Aneja, J., Reyor, L.L., Allen, T.M., Lohse, A.W., et al. 2012. Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med* 209:61-75.
265. Sugimoto, K., Ikeda, F., Stadanlick, J., Nunes, F.A., Alter, H.J., and Chang, K.M. 2003. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 38:1437-1448.

266. Boettler, T., Spangenberg, H.C., Neumann-Haefelin, C., Panther, E., Urbani, S., Ferrari, C., Blum, H.E., von Weizsacker, F., and Thimme, R. 2005. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 79:7860-7867.
267. Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R.J., Rosen, H.R., Liu, C., and Nelson, D.R. 2004. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40:1062-1071.
268. Ward, S.M., Fox, B.C., Brown, P.J., Worthington, J., Fox, S.B., Chapman, R.W., Fleming, K.A., Banham, A.H., and Klenerman, P. 2007. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol* 47:316-324.
269. Franceschini, D., Paroli, M., Francavilla, V., Videtta, M., Morrone, S., Labbadia, G., Cerino, A., Mondelli, M.U., and Barnaba, V. 2009. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 119:551-564.
270. Smyk-Pearson, S., Golden-Mason, L., Klarquist, J., Burton, J.R., Jr., Tester, I.A., Wang, C.C., Culbertson, N., Vandenbark, A.A., and Rosen, H.R. 2008. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 197:46-57.
271. Heeg, M.H., Ulsenheimer, A., Gruner, N.H., Zachoval, R., Jung, M.C., Gerlach, J.T., Raziorrouh, B., Schraut, W., Horster, S., Kauke, T., et al. 2009. FOXP3 expression in hepatitis C virus-specific CD4+ T cells during acute hepatitis C. *Gastroenterology* 137:1280-1288 e1281-1286.
272. Sabado, R.L., O'Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K.V., et al. 2010. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* 116:3839-3852.
273. Altevogt, B.M., Pankevich, D.E., Pope, A.M., and Kahn, J.P. 2012. Research agenda. Guiding limited use of chimpanzees in research. *Science* 335:41-42.
274. Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., et al. 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7:927-933.
275. Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., and Su, L. 2011. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* 140:1334-1344.
276. Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., et al. 2011. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474:208-211.
277. Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N.F., Chaput, N., and Zitvogel, L. 2008. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 9:486-494.
278. Ohira, M., Ishiyama, K., Tanaka, Y., Doskali, M., Igarashi, Y., Tashiro, H., Hiraga, N., Imamura, M., Sakamoto, N., Asahara, T., et al. 2009. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 119:3226-3235.
279. Miller, F.D., and Abu-Raddad, L.J. 2010. Evidence of intense ongoing endemic transmission of hepatitis C virus in Egypt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14757-14762.

280. Frey, S.E., Houghton, M., Coates, S., Abrignani, S., Chien, D., Rosa, D., Pileri, P., Ray, R., Di Bisceglie, A.M., Rinella, P., et al. 2010. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 28:6367-6373.
281. Barnes, E., Folgori, A., Capone, S., Swadling, L., Aston, S., Kurioka, A., Meyer, J., Huddart, R., Smith, K., Townsend, R., et al. 2012. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med* 4:115ra111.

CURRICULUM VITAE

ACADEMIC

02/2007-	Ph.D. in Microbiology and Immunology Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC.
05/2004-02/2007	M.Sc. in Biomedical Sciences Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC.
2001-2004	Bachelor's in Medical Biology Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC.

SCHOLARSHIPS

2010	Ph.D. excellence award, CRCHUM (2000\$)
2008-2012	Ph.D. award, National CIHR Research Training Program in Hepatitis C (23 300\$/year)
2006	M.Sc. excellence award, CRCHUM (2000\$)
2006	M.Sc. excellence award , Department of Biomedical Sciences, Université de Montréal (2000\$)
2005-2006	M.Sc. excellence award, Canderel/Institut du cancer de Montréal (750\$)
2004-2005	M.Sc. graduate studies award of Canada, Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (17 500\$)
2004-2005	M.Sc. excellence award, Canderel/Institut du cancer de Montréal (250\$)
2003	Undergraduate award, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (4500\$)
2002-2003	Undergraduate award Joli-Cœur Lacasse Lemieux Geoffrion Jetté St-Pier, Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières (1500\$)
2000-2001	Undergraduate Award, Fondation St-Louis Maillet APPBOUSLM Rhéa-Larose, Université de Moncton campus d'Edmundston (2500\$)
2000-2001	Undergraduate Award, Rotary Club d'Edmundston N.-B. (1000\$)
2000-2001	Undergraduate Award, Université de Moncton campus d'Edmundston (500\$)

AWARDS

2009	Ph.D. poster presentation at the 12th Annual Congres of the CRCHUM (500\$).
2008	3 rd Prize for best oral presentation at the FRSQ AIDS and Infectious Diseases Network student meeting (250\$).
2007	M.Sc. thesis ranked in the top 15% at the Université de Montréal.
2005	M.Sc. poster presentation at the 8th Annual Congres of the CRCHUM (250\$).

TECHNICAL EXPERTISE

Tissue culture:

- Primary culture of NK cells, dendritic cells, T cells and B cells
- Isolation and primary culture of immune cells infiltrating tumors

- Generation of antigen specific T cell lines and clones

Immunology:

- Multiparameter flow cytometry
- ELISA
- ELISPOT

Molecular Biology:

- RNA extraction
- Real-time RT-PCR

PUBLICATIONS

1. **Pelletier S.**, Said E., Ancuta P., Bruneau J., Shoukry N.H. Sustained Hyperresponsiveness of Dendritic Cells is Associated with Spontaneous Resolution of Acute Hepatitis C. In revision in *Journal of Virology*.
2. **Pelletier S.**, Dugast A.-S., Alter G., Ancuta P., Willems B., Bruneau J., Shoukry N.H. Cross-Talk between Natural Killer and Dendritic Cells is Intact During Acute and Chronic HCV Infection. In preparation.
3. Beq S., Rozlan S., **Pelletier S.**, Willems B., Bruneau J., Lelievre J.-D., Levy Y., Shoukry N.H. and Cheynier R. Altered thymic function during interferon therapy in HCV-infected patients. *PLoS One* (2012) 7(4):e34326.
4. Shoukry N.H., **Pelletier S.**, Chang K.M. A view to natural killer cells in hepatitis C. *Gastroenterology* (2011) 141(4):1144-8.
5. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Increased Degranulation of Natural Killer Cells during Acute HCV Correlates with the Magnitude of Virus-specific T cell Responses. *Journal of Hepatology* (2010) 53(5):805-16
6. Godin-Ethier J., **Pelletier S.**, Hanafi L.-A., Gannon P.O., Forget M.-A., Lattouf J.-B., Boulassel M.-R., Routy J.-P., Krzemien U., Tanguay S., Arbour N. and Lapointe R. Human activated T lymphocytes modulate indoleamine 2,3-dioxygenase expression in tumors through Th1/Th2 balance. *Journal of Immunology* (2009) 15;183(12):7752-60
7. **Pelletier S.**, Tanguay S., Lee S., Gunaratnam L., Arbour N. and Lapointe R. TGF- α as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunology Immunotherapy* (2009) 58(8):1207-18.
8. Forget M.-A., Turcotte S., Beauseigle D., Godin-Ethier J., **Pelletier S.**, Martin J., Tangay S. and Lapointe R. The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumors and in multiple common cancer types. *British Journal of Cancer* (2007) 26;96(4):646-53

POSTER PRESENTATIONS

1. **Pelletier S.**, Said E., Ancuta P., Bruneau J., Shoukry N.H. Increased Dendritic Cell Function During Acute HCV Infection (February 2012) 1st Canadian Symposium on Hepatitis C Virus, Montreal, QC.
2. **Pelletier S.**, Said E., Ancuta P., Bruneau J., Shoukry N.H. Increased Dendritic Cell Function During Acute HCV Infection (December 2011) 14th Annual Congress of the CRCHUM, Montreal, QC.
3. **Pelletier S.**, Said E., Ancuta P., Bruneau J., Shoukry N.H. Increased Dendritic Cell Function During Acute HCV Infection (November 2011) 2nd Annual Meeting of the Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, QC.
4. **Pelletier S.**, Said E., Ancuta P., Bruneau J., Shoukry N.H. Natural Killer Cells and Dendritic Cells Function During Acute HCV (September 2011) 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, WA, USA.
5. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (December 2010) 13th Annual Congress of the CRCHUM, Montreal, QC.

6. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (May 2010) HIV symposium of the CRCHUM, Montreal, QC.
7. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (February 2010) The 6th Canadian Digestive Diseases Week and the Annual Canadian Association for the Study of the Liver (CDDW/CASL) Winter Meeting, Toronto, ON.
8. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (December 2009) 12th Annual Congress of the CRCHUM, Montreal, QC.
9. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (October 2009) 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France.
10. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (May 2009) 96th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, Seattle, WA, USA.
11. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (April 2009) 2nd Immunology Meeting of the CRCHUM, Montreal, QC.
12. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (March 2009) 11th Annual Congress of the CRCHUM, Montreal, QC.
13. **Pelletier S.**, Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Bridging innate and adaptive immunity during acute HCV infection (April 2008) 21st Annual Meeting of the Canadian Society for Immunology, Mont-Tremblant, QC.
14. **Pelletier S.**, Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Bridging innate and adaptive immunity during acute HCV infection (December 2007) 10th Annual Congress of the CRCHUM, Montreal, QC.
15. **Pelletier S.**, Godin-Ethier J., Tanguay S., Lapointe R. Different immune cell populations infiltrate breast and kidney cancers. (March 2007) The first cytometry symposium, Canadian Cytometry Association, Montreal, QC.
16. **Pelletier S.**, Godin-Ethier J., Tanguay S., Lapointe R. Different immune cell populations infiltrate breast and kidney cancers. (December 2006) 9th Annual Congress of the CRCHUM, Montreal, QC.
17. **Pelletier S.**, Godin-Ethier J., Tanguay S., Lapointe R. Different immune cell populations infiltrate breast and kidney cancers. (October 2006) The 14th Cancer Research Institute International Cancer immunotherapy Symposia Series, New York, NY.
18. **Pelletier S.**, Lee S., Tanguay S., Lapointe R. TGF- α as a potential tumor antigen for renal cell carcinoma (December 2005) 8th Annual Congress of the CRCHUM, Montreal, QC.
19. **Pelletier S.**, Lee S., Tanguay S., Lapointe R. TGF- α as a potential tumor antigen for renal cell carcinoma (December 2004) 7th Annual Congress of the CRCHUM, Montreal, QC.

ORAL PRESENTATIONS

1. **Pelletier S.**, Said E., Ancuta P., Bruneau J., Shoukry N.H. Dendritic Cells Activation During Acute HCV (February 2012). The 8th Canadian Digestive Diseases Week and the Annual Canadian Association for the Study of the Liver (CDDW/CASL) Winter Meeting, Montreal, QC.
2. **Pelletier S.**, Said E., Ancuta P., Bruneau J., Shoukry N.H. Dendritic Cells Activation During Acute HCV (November 2011). FRSQ AIDS and Infectious Diseases Network student meeting, Montreal, QC.
3. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (October 2009). 1st Annual Meeting of the Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, QC.
4. **Pelletier S.**, Drouin C., Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (February 2009) The 5th Canadian Digestive Diseases Week and the Annual Canadian Association for the Study of the Liver (CDDW/CASL) Winter Meeting, Banff, AB.

5. **Pelletier S.**, Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Natural Killer cells activation following HCV exposure (November 2008) FRSQ AIDS and Infectious Diseases Network student meeting , Montreal, QC.
6. **Pelletier S.**, Bédard N., Bruneau J., Khakoo S., Shoukry N. Bridging innate and adaptive immunity during acute HCV infection (November 2007) FRSQ AIDS and Infectious Diseases Network student meeting, Montreal, QC.
7. **Pelletier S.**, Lee S., Tanguay S., Lapointe R. TGF- α as a potential tumor antigen for renal cell carcinoma (November 2004) 15th Scientific meeting of the Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC.