

Université du Québec  
INRS – Institut Armand-Frappier

**IMPACT DU VIRUS DE L'HÉPATITE C SUR  
LES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE**

Par  
Marie-Ève Bilodeau

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.sc) en immunologie et virologie

**JURY D'ÉVALUATION**

Président du jury  
et examinateur interne

Dr Patrick Labonté  
INRS – Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr Louis Flamand  
Centre de recherche du CHUL, Québec

Directeur de recherche

Dr Alain Lamarre  
INRS – Institut Armand-Frappier



## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Alain Lamarre de m'avoir fait confiance en me confiant ce projet et de m'avoir laissé la chance d'orienter mes recherches vers des avenues qui n'étaient pas nécessairement prévues au départ. Sa patience, sa confiance et son aide m'ont fait apprécier mes années de travail dans son laboratoire.

J'aimerais également remercier Esther Tarrab, notre associée de recherche, pour sa bonne humeur, son positivisme et sa précieuse aide technique.

Un merci particulier à Véronique Bougie pour m'avoir expliqué le projet et m'avoir dirigée à mes débuts et à Emmanuel Moreau, pour les longues discussions qu'on a eues et les idées nouvelles que tu apportais au projet. Ton calme légendaire m'a permis de passer au travers des périodes plus difficiles. Merci également aux collègues passés et présents avec qui j'ai passé d'agréables moments au laboratoire : Patrick Lacasse, Isabelle Meunier, Maude Bigras, Tania Charpentier, Valérie Janelle et Matthieu Daugan, de même que les membres du laboratoire du Dr Pierre Talbot que j'ai côtoyés à tous les jours. J'aimerais également remercier le laboratoire du Dr Patrick Labonté pour l'aide et le matériel fourni en ce qui concerne la production du virus.

Finalement, je ne serais pas rendue à écrire ces lignes sans l'appui de mon père et de mon copain Pierre-André. Votre support, votre compréhension et votre patience m'ont été essentiels dans la réalisation de ma maîtrise et je vous en suis très reconnaissante.

## RÉSUMÉ

On estime à 170 millions le nombre de personnes infectées à travers le monde par le virus de l'hépatite C (VHC). Dans 80% des cas, l'infection va devenir persistante ce qui peut mener, après plusieurs années, à des pathologies importantes du foie. Il est connu que l'élimination du virus dans la phase aiguë de l'infection corrèle avec une réponse cellulaire adaptative ( $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) qui est rapide, multi-spécifique et soutenue dans le temps, alors que les patients qui vont développer une infection chronique ont généralement une réponse cellulaire faible, voire complètement absente. À ce jour, les raisons qui expliqueraient pourquoi seulement 20% des individus sont capables de générer une réponse cellulaire adéquate pour éliminer le virus demeurent inconnues. Cela est dû au fait que la phase aiguë de l'infection, là où a lieu l'induction de la réponse cellulaire, demeure asymptomatique dans la majorité des cas et également par le fait qu'il n'existait aucun système de production du VHC en culture cellulaire avant 2005. Le but de la présente étude était donc d'analyser l'impact du VHC sur les fonctions des cellules du système immunitaire dans un contexte mimant l'infection aiguë.

Nous avons utilisé le clone infectieux JFH1 (pour *Japanese fulminant hepatitis*) afin de produire du virus en culture cellulaire dans le but de mettre différentes populations de cellules du système immunitaire en culture avec les surnageants infectieux et nous avons ensuite analysé l'impact du virus sur les fonctions de ces cellules *in vitro*. Nos résultats démontrent, tout d'abord, que lors de la production du virus en culture cellulaire, l'infection par JFH1 de cellules d'hépatocarcinome humain Huh-7.5 (pour *Human hepato cellular carcinoma cell line*) résulte en une baisse significative de la viabilité cellulaire et que cette baisse de viabilité corrèle avec une augmentation de l'apoptose. En ce qui concerne les cellules immunitaires, nous démontrons que l'apoptose induite par le VHC dans les cellules hépatiques, plutôt que le virus lui-même, induit une augmentation de la production de cytokines par les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) et que le virus ne semble pas interférer avec la signalisation des récepteurs de la famille « Toll » (TLRs pour *Toll-like receptors*) dans ces cellules. Afin d'analyser l'impact du virus sur les cellules dendritiques (CDs), nous avons généré des CDs à partir de monocytes isolés de donneurs sains (MoCDs). Ces cellules ont ensuite été mises en

culture avec du surnageant infectieux. Nos résultats démontrent que ni le virus, ni l'apoptose induite par l'infection chez les cellules Huh-7.5 ne semble bloquer la maturation des MoCDs, ni leur fonction allostimulatrice. Par contre, et contrairement aux expériences réalisées avec les PBMCs totaux, l'apoptose ne génère pas une augmentation de la production de cytokines par les MoCDs, elle semble au contraire diminuer la production de cytokines induite par la présence du virus. Finalement, nous avons mis en co-cultures des MoCDs avec des cellules Huh-7.5 (infectées ou non), de même qu'avec des cellules Huh-7.5 non infectées, mais apoptotiques. Dans ce cas, nous démontrons que l'apoptose induite par l'infection augmente l'expression des marqueurs d'activation et de co-stimulation sur les MoDCs et ce, en absence de stimuli de maturation.

Dans l'ensemble, nos résultats démontrent que l'apoptose induite lors de l'infection par le VHC, plutôt que le virus seul, semble avoir un impact sur les cellules du système immunitaire. Ces résultats peuvent représenter de façon plus réaliste ce qui se passe dans le foie des patients infectés, où les cellules immunitaires infiltrant cet organe sont en contact étroit avec les cellules hépatiques infectées et apoptotiques.

---

Marie-Ève Bilodeau

---

Alain Lamarre

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	III
RÉSUMÉ .....	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XII
INTRODUCTION.....	1
LA REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
<b>1. VIRUS DE L'HÉPATITE C .....</b>	<b>6</b>
1.1 DÉCOUVERTE ET CARACTÉRISTIQUES DU VIRUS .....	6
1.2 ÉPIDÉMIOLOGIE.....	8
1.3 DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME DE PRODUCTION VIRALE EN CULTURE CELLULAIRE.....	9
<b>2. RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTIVIRALE INNÉE.....</b>	<b>11</b>
2.1 LES RÉCEPTEURS DE L'IMMUNITÉ INNÉE .....	11
2.2 LES INTERFÉRONS DE TYPE 1.....	13
<b>3. LES CELLULES DENDRITIQUES : LE LIEN ENTRE LES RÉPONSES IMMUNITAIRES INNÉE ET ADAPTATIVE.....</b>	<b>14</b>
3.1 ORIGINE, POPULATIONS ET RÔLE GÉNÉRAL DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES.....	14
3.2 CAPTURE ET APPRÊTEMENT DES ANTIGÈNES PAR LES CELLULES DENDRITIQUES IMMATURES.....	15
3.3 PROCESSUS DE MATURATION ET FONCTIONS DES CELLULES DENDRITIQUES MATURES .....	16
<b>4. INDUCTION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE ADAPTATIVE PAR LES CELLULES DENDRITIQUES .....</b>	<b>19</b>
4.1 PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE VIA LE CMH-I : INDUCTION DE LA RÉPONSE T CD8 <sup>+</sup> .....	19

4.2 PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE VIA LE CMH-II: INDUCTION DE LA RÉPONSE T CD4 <sup>+</sup>	20
4.3 POLARISATION DE LA RÉPONSE T AUXILIAIRE PAR LES CELLULES DENDRITIQUES..	21
4.4 INHIBITION DES FONCTIONS DES CELLULES DENDRITIQUES PAR LES VIRUS.....	22
<b>5. RÉPONSE IMMUNITAIRE LORS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HÉPATITE C.....</b>	<b>23</b>
5.1 IMPORTANCE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE CELLULAIRE .....	23
5.2 INTERFÉRENCE DU VIRUS DE L'HÉPATITE C AVEC LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	26
5.2.1 INTERFÉRENCE AVEC LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE .....	26
5.2.2 LES CELLULES DENDRITIQUES CHEZ LES PATIENTS INFECTÉS DE FAÇON CHRONIQUE .....	27
5.2.3 INFECTION DES CELLULES IMMUNITAIRES PAR LE VHC .....	28
<b>6. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA PRÉSENTE ÉTUDE .....</b>	<b>29</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>30</b>
1. LIGNÉE CELLULAIRE.....	31
2. PRODUCTION VIRALE – JFH1 .....	31
3. QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL PAR RT-PCR QUANTITATIF .....	31
4. DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX PAR IMMUNOFLUORESCENCE.....	33
5. ÉVALUATION DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE CHEZ LES CELLULES HUH-7.5 INFECTÉES....	33
6. ÉVALUATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'INFECTION .....	34
7. ISOLEMENT DES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE .....	35
8. ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE INCUBÉES AVEC LE VIRUS ET STIMULÉES VIA LES TLRs .....	36
9. ISOLEMENT DES MONOCYTES PAR AUTOMACS.....	36
10. GÉNÉRATION DE CELLULES DENDRITIQUES À PARTIR DE MONOCYTES (MoCDs).....	37
11. MATURATION DES MoCDs INCUBÉES AVEC LE VIRUS ET ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION SUR LES MoCDs PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX .....	37
12. ÉVALUATION DE LA CAPACITÉ ALLOSTIMULATRICE DES MoCDs PAR RÉACTION LYMPHOCYTAIRE MIXTE (MLR) .....	38
13. QUANTIFICATION DES CYTOKINES PAR ELISA .....	39
14. CO-CULTURES DE CELLULES HUH-7.5 ET MoCDs .....	40

15. ANALYSES STATISTIQUES.....	40
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>41</b>
<b>1. INFECTION DES CELLULES HUH-7.5 PAR JFH1 .....</b>	<b>42</b>
1.1 QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL ET DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX.....	42
1.2 VIABILITÉ CELLULAIRE DES CELLULES HUH-7.5 INFECTÉES PAR JFH1 .....	43
1.3 QUANTIFICATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR JFH1 .....	44
<b>2. PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE INCUBÉES AVEC JFH1 ET STIMULÉES PAR LES LIGANDS DES TLRs.....</b>	<b>47</b>
<b>3. EFFET DE JFH1 SUR LES CELLULES DENDRITIQUES GÉNÉRÉES À PARTIR DE MONOCYTES.....</b>	<b>51</b>
3.1 EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION.....	51
3.2 ÉVALUATION DE LA FONCTION ALLOSTIMULATRICE DES MoCDS PAR RÉACTION LYMPHOCYTAIRE MIXTE (MLR).....	54
3.3 PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES MoCDS.....	56
<b>4. CO-CULTURES DE CELLULES HUH-7.5 ET MoCDS – EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION .....</b>	<b>57</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>1. INFECTION DES CELLULES HUH-7.5 PAR JFH1 .....</b>	<b>62</b>
1.1 QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL ET DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE.....	62
1.2 L'INFECTION PAR JFH1 INDUIT L'APOPTOSE DANS LES CELLULES HUH-7.5 .....	63
<b>2. L'APOPTOSE INDUITE DANS LES CELLULES HUH-7.5 LORS DE L'INFECTION PAR JFH1 AUGMENTE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES PBMCs STIMULÉES PAR LES LIGANDS DES TLRs .....</b>	<b>66</b>
<b>3. EFFET DE JFH1 SUR LES CELLULES DENDRITIQUES GÉNÉRÉES À PARTIR DE MONOCYTES.....</b>	<b>69</b>
3.1 JFH1 N'ALTÈRE PAS L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION ET DE CO-STIMULATION DES MoCDS .....	70
3.2 LA FONCTION ALLOSTIMULATRICE DES MoCDS N'EST PAS AFFECTÉE PAR JFH1..	72

3.3 JFH1 AUGMENTE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES MoCDs .....	73
4. LA PRÉSENCE DE CELLULES HUH-7.5 APOPTOTIQUES INDUIT UNE CERTAINE MATURATION DES MoCDs.....	76
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	82
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	87

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1 : REPRÉSENTATION DE LA POLYPROTÉINE PRODUITE LORS DE LA RÉPLICATION DU VHC. ....</b>	<b>7</b>
<b>FIGURE 2 : LE PLASMIDE pJFH1 CONSTRUIT À PARTIR DE L'ADNC CORRESPONDANT AU GÉNOME COMPLET DU VIRUS ISOLÉ D'UN PATIENT ATTEINT D'UNE HÉPATITE FULMINANTE CAUSÉE PAR LE VHC .....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURE 3 : INTERACTION ENTRE LES CELLULES DENDRITIQUES ET LES LYMPHOCYTES T NAÏFS .....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURE 4 : REPRÉSENTATION DES RÉPONSES IMMUNITAIRES CELLULAIRES T CD4<sup>+</sup> ET CD8<sup>+</sup> INDUITES LORS DE LA PHASE AIGUË DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HÉPATITE C .....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURE 5 : QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL TOTAL À DIFFÉRENTS JOURS POST-INFECTION DANS LE SURNAGEANT DE CULTURE DE CELLULES HUH-7.5 INFECTÉES PAR JFH1 ET IMMUNOFLUORESCENCE DÉMONTRANT LA PRÉSENCE DE FOYERS DE CELLULES INFECTÉES LORS DE LA DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX DES SURNAGEANTS .....</b>	<b>42</b>
<b>FIGURE 6 : VIABILITÉ DES CELLULES HUH-7.5 INFECTÉES PAR JFH1 À DIFFÉRENTS TEMPS POST-INFECTION.....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURE 7 : ÉVALUATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'INFECTION DANS LES CELLULES HUH-7.5 PAR ELISA.....</b>	<b>45</b>
<b>FIGURE 8 : ÉVALUATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'INFECTION DANS LES CELLULES HUH-7.5 PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX.....</b>	<b>46</b>
<b>FIGURE 9 : PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES PBMCs TOTALES FRAÎCHEMENT ISOLÉES DE DONNEURS SAINS ET INCUBÉES AVEC LE VIRUS PUIS STIMULÉES PAR DES LIGANDS DES TLRs PENDANT 48H .....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURE 10 : EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION SUR LES MoCDs INCUBÉES OU NON AVEC DU SURNAGEANT DU JOUR 11 POST-INFECTION DE CELLULES HUH-7.5 NON-INFECTÉES (MOCK) OU INFECTÉES (JFH1) .....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURE 11 : EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION SUR LES MoCDs INCUBÉES AVEC DU SURNAGEANT DU JOUR 25 POST-INFECTION DE CELLULES HUH-7.5 NON-INFECTÉES (MOCK) OU INFECTÉES (JFH1) .....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURE 12 : RÉACTION LYMPHOCYTAIRE MIXTE (MLR) DE MoCDs PRÉALABLEMENT INCUBÉES AVEC JFH1 OU DU SURNAGEANT NON INFECTIEUX .....</b>	<b>55</b>

**FIGURE 13** : PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES MoCDs MATURES INCUBÉES AVEC JFH1  
OU DU SURNAGEANT NON INFECTIEUX .....57

**FIGURE 14** : DÉTERMINATION PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DU POURCENTAGE DE CELLULES  
HUH-7.5 APOPTOTIQUES QUI ONT ÉTÉ MISES EN CO-CULTURES AVEC LES  
MoCDs ET EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION SUR LES MoCDs  
MISES EN CO-CULTURES AVEC LES CELLULES HUH-7.5 DU JOUR 6 POST-  
INFECTION .....58

**FIGURE 15** : DÉTERMINATION PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DU POURCENTAGE DE CELLULES  
HUH-7.5 APOPTOTIQUES QUI ONT ÉTÉ MISES EN CO-CULTURES AVEC LES  
MoCDs ET EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION SUR LES MoCDs  
MISES EN CO-CULTURES AVEC LES CELLULES HUH-7.5 DU JOUR 23 POST-  
INFECTION .....59

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

°C	Degré Celcius
7-AAD	7-amino-actinomycine D
µg	Microgramme
µl	Microlitre
AcN	Anticorps neutralisants
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APC	Allophycocyanine
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNsb	Acide ribonucléique simple brin
BSA	Albumine sérique bovine
CDs	Cellules dendritiques
CLs	Cellules de Langerhans
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus humain
CPAs	Cellules présentatrices d'antigènes
CTLs	Lymphocytes T cytotoxiques
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FcR	Récepteur de la portion FC des immunoglobulines
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GM-CSF	«Granulocyte macrophage colony-stimulating factor»
Huh-7 / Huh-7.5	Lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain (« Human hepato cellular carcinoma cell line »)
IFN	Interféron
IFNAR	Récepteur de l'interféron-α
IL	Interleukine
imCDs	Cellules dendritiques immatures

IPS-1	« IFN- $\beta$ promotor stimulator 1 »
IRES	Site interne d'entrée des ribosomes
IRF	«Interferon regulatory factor»
ISGs	Gènes stimulés par l'interféron
JFH1	«Japanese fulminant hepatitis 1»
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Acide lipotéichoïque
LyB	Lymphocytes B
LyT	Lymphocytes T
mCDs	Cellules dendritiques matures
MFI	Intensité moyenne de fluorescence
ml	Millilitre
MLR	Réaction lymphocytaire mixte
MMLV	« Moloney murine leukemia virus »
MoCDs	Cellules dendritiques générées à partir de monocytes
MOI	Multiplicité d'infection
MVs	Microvésicules
NLRs	Récepteurs de domaines d'oligomérisation et de liaison aux nucléotides
PAMPs	Patrons moléculaires associés aux pathogènes
PBMCs	Cellules mononucléées du sang périphérique
pCDs	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
pCMH	CMH-peptide
PD-1	« Programmed death 1 »
PFA	Paraformaldéhyde
PE	Phycoérythrine
PGE-2	Prostaglandine E2
p.i.	Post-infection
PKR	Protéine kinase R
Poly (I :C)	Acide poly (inosinique : cytidylique)
PRRs	«Pattern-recognition receptors»

PS	Phosphatidylsérine
p/v	Poids/volume
R848	Imidazoquinoline resiquimod
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	«Retinoic acid-inducible gene-I»
RLRs	Récepteurs du gène inductible par l'acide rétinoïque
RT	Rétrotranscription
SBF	Sérum de bovin foetal
strep/pen	Streptomycine/pénicilline
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGF- $\beta$	«Transforming growth factor $\beta$ »
T <sub>H</sub>	Lymphocytes T auxiliaires
TLR	Récepteur de la famille «Toll»
TNF- $\alpha$	«Tumor necrosis factor $\alpha$ »
TP	Température pièce
T <sub>REG</sub>	Lymphocytes T régulateurs
UTR	Région non traduite
UVs	Rayons ultra-violets
VHC	Virus de l'hépatite C
VHS	Virus herpes simplex
v/v	Volume/volume

## INTRODUCTION

Avec 170 millions de personnes infectées à travers le monde et une proportion d'environ 80% de patients qui développent une infection chronique, le virus de l'hépatite C (VHC) représente un problème de santé majeur pour lequel aucun vaccin n'est encore disponible. Il est aujourd'hui connu que son élimination requiert une réponse immunitaire cellulaire vigoureuse, soutenue dans le temps et ciblant de multiples épitopes viraux (Shoukry et al. 2003; Thimme et al. 2001; Lechner et al. 2000). Malgré de nombreuses études, les raisons qui pourraient expliquer l'incapacité chez la majorité des patients atteints par le VHC à élaborer une telle réponse cellulaire demeurent encore inconnues à ce jour. L'hypothèse de notre laboratoire est que le VHC interfère avec les fonctions des cellules du système immunitaire dans la phase aiguë de l'infection, plus particulièrement au niveau de la présentation des antigènes viraux.

L'induction d'une réponse cellulaire adaptative nécessite la présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T (LyT) et leur activation par les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). Les cellules dendritiques (CDs) étant les CPAs les plus efficaces, nombreux sont ceux qui croient que le VHC pourrait interférer avec les fonctions de ces cellules, ce qui pourrait empêcher l'induction de la réponse cellulaire nécessaire à l'élimination du virus. Bien que plusieurs équipes aient démontré que les fonctions des CDs étaient altérées chez les patients infectés de façon chronique, les résultats présentés dans la littérature sont contradictoires à ce sujet puisqu'il a également été observé, dans d'autres cas, que ces cellules sont totalement fonctionnelles chez les patients infectés chroniquement par le VHC. Par ailleurs, au niveau de l'immunité innée, il a été observé que le virus pourrait interférer avec les mécanismes de reconnaissance des pathogènes, notamment en inhibant les voies de signalisation des récepteurs de type « Toll » (TLRs pour *Toll-like receptors*) ou en bloquant la production de cytokines ayant des propriétés antivirales par les cellules du système immunitaire.

Bien que certaines études semblent démontrer que le virus puisse inhiber les fonctions des cellules du système immunitaire, elles ont été effectuées lors de la phase chronique de l'infection et ne sont donc pas nécessairement représentatives de ce qui se produit dans la

phase aiguë. Les études sur l'impact du VHC dans la phase aiguë de l'infection ont été compliquées par le fait que l'infection est asymptomatique dans la majorité des cas, mais également parce qu'il n'existait, avant 2005, aucun système de production de virus en culture cellulaire. Dans ce projet, nous désirions donc analyser l'impact du VHC sur les cellules du système immunitaire dans un contexte mimant l'infection aiguë puisque c'est à ce moment que l'élaboration de la réponse cellulaire nécessaire à l'élimination du virus a lieu.

Pour ce faire, nous avons utilisé le clone infectieux JFH1 développé en 2005 qui permet la production de virus infectieux en culture cellulaire. Les surnageants infectieux ont été utilisés *in vitro* sur différentes populations de cellules du système immunitaire et les fonctions de ces cellules ont été analysées.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'impact de la réplication du virus sur les hépatocytes infectés lors de la production du virus en culture cellulaire afin de mieux caractériser les surnageants infectieux produits. Nos résultats démontrent que l'infection par JFH1 induit l'apoptose dans les cellules Huh-7.5 en début d'infection, ce qui expliquerait en partie la baisse de viabilité observée dans ces cellules.

Par la suite, nous avons incubé des PBMCs avec du surnageant infectieux avant de les stimuler par des ligands de différents TLRs impliqués dans la reconnaissance des virus. Nous voulions ainsi vérifier si le virus pouvait interférer avec la signalisation des TLRs et inhiber la production subséquente de cytokines par les PBMCs. Comme nous avons observé que les cellules Huh-7.5 étaient en apoptose dans les premiers jours de l'infection, nous avons comparé l'effet produit par des surnageants infectieux provenant de cellules apoptotiques ou non sur la production de cytokines par les PBMCs que nous avons quantifiée par ELISA. Nos résultats démontrent que cette apoptose semble augmenter la production de cytokines par les PBMCs, tandis que le virus n'induit pas une augmentation de la quantité de cytokines sécrétées, mais n'inhibe pas non plus cette sécrétion, suggérant donc qu'il n'interfère pas avec les voies de signalisation des TLRs dans les PBMCs.

Afin de vérifier si le VHC peut interférer avec les fonctions des CDs dans un contexte qui mime l'infection aiguë, nous avons mis des CDs générées à partir de monocytes isolés de sujets sains (MoCDs) avec des surnageants infectieux provenant de cellules Huh-7.5 qui étaient ou non en apoptose. Après induction de la maturation des MoCDs, nous avons analysé différentes fonctions de ces cellules, telles que leur capacité à produire des cytokines immunomodulatrices, leur maturation et leur fonction allostimulatrice. En ce qui concerne la production de cytokines, il semblerait que le virus augmente la production de cytokines par les MoCDs, mais que l'apoptose diminue cette production, sans toutefois qu'elle soit inférieure à ce qui est obtenu lorsque les MoCDs sont incubées avec du surnageant non infectieux avant de subir la maturation. La maturation des MoCDs a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs de maturation et de co-stimulation. Les résultats obtenus suggèrent que ni la présence du virus ni l'apoptose n'interfère avec la maturation des MoCDs puisque les niveaux d'expression des marqueurs analysés sont similaires entre les MoCDs incubées avec du surnageant infectieux (provenant de cellules apoptotiques ou non) et celles incubées avec du surnageant non infectieux. La fonction allostimulatrice des MoCDs a été évaluée par la réaction lymphocytaire mixte et comme dans le cas de la maturation de ces cellules, nos résultats indiquent que ni le virus ni l'apoptose induite par l'infection ne semble affecter cette fonction puisqu'aucune différence significative n'a été observée entre les MoCDs incubées avec du surnageant infectieux provenant ou non de cellules Huh-7.5 apoptotiques et les MoCDs incubées avec du surnageant contrôle non infectieux.

Finalement, puisque le foie est un organe particulier où les hépatocytes peuvent être en contact étroit et direct avec les cellules du système immunitaire, nous avons effectué des expériences de co-cultures entre des MoCDs et des cellules Huh-7.5 infectées ou non et apoptotiques ou non afin de vérifier si le contact entre ces deux populations cellulaires pouvait affecter les MoCDs. Selon nos résultats, l'apoptose induite lors de l'infection des cellules Huh-7.5 par JFH1 générerait une certaine maturation des MoCDs. Cette partie de notre étude reflète probablement davantage ce qui se passe au niveau du foie de patients infectés.

Dans l'ensemble, la présente étude démontre de façon générale que le VHC seul ne semble pas avoir d'effet inhibiteur sur les cellules du système immunitaire. Cependant, l'apoptose induite dans les hépatocytes pourrait, quant à elle, avoir un impact plus important sur les cellules immunitaires.

## **CHAPITRE 1**

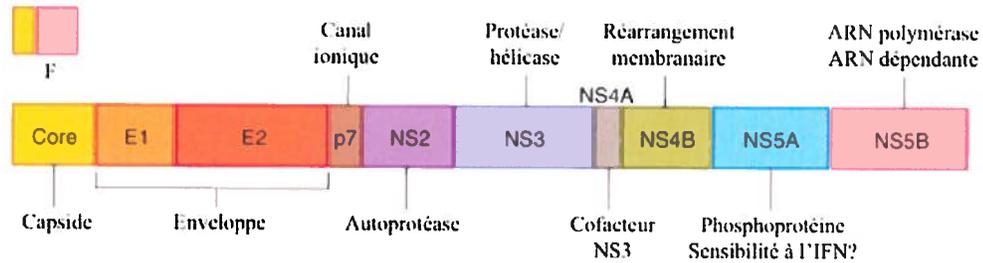
### **LA REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. VIRUS DE L'HÉPATITE C

### 1.1 DÉCOUVERTE ET CARACTÉRISTIQUES DU VIRUS

En 1975, il fut observé que des patients qui avaient contracté une hépatite à la suite d'une transfusion sanguine n'étaient pas infectés par les virus de l'hépatite A ou B. L'agent causal, alors inconnu, fut nommé hépatite non-A, non-B (Feinstone et al. 1975). En 1989, une banque d'ADN complémentaire (ADNc) produite à partir du sérum d'un chimpanzé infecté a permis l'identification du virus. Depuis ce jour, le virus porte le nom de virus de l'hépatite C (Choo et al. 1989).

Le virus fait partie du genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae* (Robertson et al. 1998). Les isolats du VHC sont regroupés en 6 génotypes et en plus d'une centaine de sous-types (Simmonds et al. 2005). Le génome viral est composé d'un ARN simple brin (ARNsb) à polarité positive de 9.6 kilobases et contient un cadre de lecture ouvert permettant la production d'une seule polyprotéine de 3010-3040 acides aminés (Bartenschlager, Frese, and Pietschmann 2004). Le génome contient également deux régions non traduites (UTRs pour *untranslated region*) l'une en 5' qui contient le site interne d'entrée des ribosomes ou IRES et l'autre en 3' qui sont essentielles à la réplication du génome et à la traduction de la polyprotéine. Une fois produite, la polyprotéine est clivée de manière co- et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales pour générer les 11 protéines virales (Bartenschlager, Frese, and Pietschmann 2004). La partie N-terminale code pour les protéines structurales : Core (qui forme la nucléocapside) et les glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2. La région structurale est suivie des protéines non-structurales p7 (qui serait un canal ionique) et NS2 à NS5B impliquées, entre autres, dans le clivage de la polyprotéine et la réplication virale (figure 1) (Lindenbach and Rice 2005; Penin et al. 2004). Le virus code également pour une autre protéine, la protéine F produite par un cadre de lecture alternatif à partir de la région codant pour la protéine Core (Lindenbach and Rice 2005). Le rôle de cette protéine est encore peu connu (Branch et al. 2005).



**Figure 1 : Représentation de la polyprotéine produite lors de la réplication du VHC et de la protéine F produite par un cadre de lecture alternatif. Les fonctions des différentes protéines structurales et non-structurales sont indiquées.**

Adapté de Dustin and Rice 2007

Le virus infecte les hépatocytes. Plusieurs récepteurs et co-récepteurs cellulaires ont été identifiés. La tétraspanine CD81 (Pileri et al. 1998), la Claudin-1 (Evans et al. 2007) et l'occludine (Ploss et al. 2009) semblent être essentiels pour l'entrée du virus dans les cellules cibles. Le récepteur scavenger de type I (SR-B1) (Scarselli et al. 2002), l'héparine-sulfate (Barth et al. 2003), les lectines DC-SIGN et L-SIGN (Cormier et al. 2004) et le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R) (Agnello et al. 1999) seraient également impliqués dans l'attachement et l'entrée du VHC dans les cellules hôtes.

Les modèles animaux sont très restreints pour l'étude du VHC. Le seul animal qui peut être infecté par le virus est le chimpanzé. Par contre, les études chez le chimpanzé sont compliquées par le fait qu'ils sont difficiles à obtenir, que la recherche sur ces animaux pose des problèmes éthiques et que les études sont très coûteuses. L'infection des souris n'étant pas possible, des systèmes de xénotransplantation d'hépatocytes humains infectés dans des souris immunodéficientes ont été développés (Mercer et al. 2001). Par contre, les xénogreffes ont une courte durée de vie et les titres de réplication virale obtenus dans ces modèles sont faibles (Bartenschlager, Frese, and Pietschmann 2004). Cependant, une étude récente a démontré que la xénogreffe d'hépatocarcinome humain tumorigénique susceptible à l'infection par le VHC permettait la réplication du virus à des taux importants à l'intérieur des tumeurs, de même que la production de particules infectieuses

dans le sérum des souris. Ce nouveau système pourrait permettre le développement de composés anti-viraux efficaces contre le VHC (Guevin, Lamarre, and Labonte 2009).

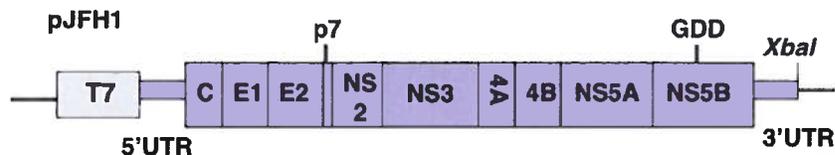
## 1.2 ÉPIDÉMIOLOGIE

En 1999, l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé à 170 millions le nombre de personnes infectées à travers le monde par le VHC (Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium 1999). Le virus se transmet par voie parentérale et dans les pays développés, la principale voie de transmission est l'utilisation de drogues intraveineuses. Dans certains pays où la détection du virus dans les produits de transfusions sanguines n'est pas effectuée de façon systématique, ces dernières sont encore une source importante de transmission du virus (Alter 2007). Le virus cause une infection persistante dans environ 80% des cas. Parmi les patients infectés de façon chronique, environ 20% vont développer une cirrhose plus ou moins 20 ans après l'infection et une fois la cirrhose établie, les probabilités de développer un carcinome hépatocellulaire sont de 1 à 4% par année (Lauer and Walker 2001). Ces complications font en sorte que le VHC est la cause principale de transplantation du foie dans les pays développés (Shepard, Finelli, and Alter 2005). Dans la majorité des cas, l'infection est asymptomatique. En effet, seulement 20 à 30% des patients vont présenter des symptômes (Orland, Wright, and Cooper 2001). Pour le moment, aucun vaccin n'a encore été développé. Un traitement antiviral composé d'interféron- $\alpha$ -pegylé combiné à la ribavirine est cependant disponible. Par contre, il comporte de nombreux effets secondaires et induit une réponse variable chez les patients selon, entre autres, le génotype par lequel ils sont infectés (Liang et al. 2000). Par exemple, le traitement du génotype 1, qui est le génotype prédominant en Amérique du Nord, est efficace dans seulement 40-45% des cas, alors que pour les génotypes 2 et 3, le traitement permet d'éradiquer le virus dans 80% des cas (Fried et al. 2002; Manns et al. 2001).

### 1.3 DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME DE PRODUCTION VIRALE EN CULTURE CELLULAIRE

L'étude du VHC (cycle de réplication, pathogenèse et persistance) a été limitée par le fait que pendant de nombreuses années, il n'existait aucun système de production du virus en culture cellulaire. L'infection d'hépatocytes primaires ou de lignées cellulaires avec du sérum provenant de patients chroniquement infectés a largement été décrite par plusieurs groupes (Banaudha et al. 2010; Podevin et al. 2010; Rumin et al. 1999; Fournier et al. 1998; Lanford et al. 1994; Iacovacci et al. 1993). La culture *in vitro* de cellules primaires isolées de patients infectés a également été utilisée (Ito et al. 1996). Par contre, les taux de réplication virale obtenus dans ces conditions étaient faibles (pour une revue de littérature complète voir (Bartenschlager, Frese, and Pietschmann 2004)). De plus, ces systèmes présentaient de nombreuses contraintes : disponibilité limitée des cellules primaires, variabilité dans l'infectivité des sérums utilisés et faible reproductibilité (Bartenschlager and Pietschmann 2005; Bartenschlager and Lohmann 2000). Par la suite, la transfection de lignées cellulaires hépatiques avec des génomes viraux clonés a été tentée. Bien que cette méthode comportait certains avantages par rapport à celles mentionnées précédemment, pour des raisons inconnues peu d'équipes ont pu démontrer qu'il y avait réplication du VHC à la suite de la transfection (Dash et al. 1997; Yoo et al. 1995). Les systèmes de réplicons, basés sur l'auto-réplication d'ARNs viraux dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain Huh-7, ont ensuite été développés (Lohmann et al. 1999) permettant la réplication du virus à des taux 100 000 fois plus importants que ceux obtenus dans les systèmes de culture *in vitro* (Bartenschlager and Lohmann 2001). Il a été démontré que l'apparition de mutations adaptatives dans le génome viral augmentait l'efficacité de réplication (Lohmann et al. 2003) et pour une revue de littérature voir (Bartenschlager, Frese, and Pietschmann 2004). Par ailleurs, la proportion de cellules Huh-7 transfectées qui supportaient la réplication virale était minime. Afin d'établir des lignées cellulaires plus permissives à la réplication, des cellules Huh-7 contenant les réplicons ont été traitées de manière prolongée à l'interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ), ce qui a permis d'éliminer les réplicons à l'intérieur des cellules. Ces cellules traitées ont ensuite été transfectées de nouveau avec les réplicons. Les résultats démontrent qu'une plus grande proportion de cellules ainsi traitées supportaient la réplication des ARNs (Blight,

McKeating, and Rice 2002). Le clone Huh-7.5, hautement permissif pour la réplication d'ARNs sous-génomiques ou complets, a ainsi été isolé (Blight, McKeating, and Rice 2002). Il semble qu'une mutation ponctuelle dans RIG-I (pour *Retinoic acid-inducible gene-1*) chez les cellules Huh-7.5, de même que la faible expression du TLR-3 chez les cellules Huh-7 expliqueraient la permissivité des cellules Huh-7.5 à la réplication du VHC (Li, Foy et al. 2005; Sumpter et al. 2005). RIG-I reconnaît l'ARN double brin (ARNdb) et mène à la phosphorylation et à la translocation nucléaire d'IRF-3 (pour *interferon regulatory factor-3*) qui est nécessaire à la production d'IFN. Ainsi, l'absence d'induction d'IFN favoriserait la réplication du VHC dans les cellules Huh-7.5. Malgré ces améliorations, la production de particules virales n'a pu être mise en évidence dans ces systèmes de réplicons (Bartenschlager, Frese, and Pietschmann 2004). Puis en 2005, l'équipe de Wakita a produit le clone infectieux JFH1 (Wakita et al. 2005). Le génome viral, de génotype 2a, a été isolé chez un patient présentant une hépatite fulminante et rétrotranscrit en ADNc (Kato et al. 2003). L'ADNc correspondant au génome complet a ensuite été introduit en aval du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 (figure 2).



**Figure 2 : Le plasmide pJFH1 construit à partir de l'ADNc correspondant au génome complet du virus isolé d'un patient atteint d'une hépatite fulminante causée par le VHC. La transfection de cellules Huh-7 avec ce plasmide permet la réplication du génome et la production en culture cellulaire de particules infectieuses.**

Tiré de Wakita et al. 2005

Après linéarisation et transcription *in vitro* du génome viral, des cellules Huh-7 ont été transfectées. L'équipe de Wakita a pu démontrer que non seulement le génome JFH1 se réplique efficacement, mais aussi que le réplicon permet la sécrétion de particules virales qui sont infectieuses tant *in vitro* (infection de cellules Huh-7 naïves) qu'*in vivo* (infection de chimpanzés) (Wakita et al. 2005).

## 2. RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTIVIRALE INNÉE

### 2.1 LES RÉCEPTEURS DE L'IMMUNITÉ INNÉE

Le système immunitaire inné reconnaît les micro-organismes via des récepteurs de reconnaissance de motifs ou PRRs (pour *pattern-recognition receptors*). Ces PRRs reconnaissent des patrons moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs (pour *pathogen-associated molecular patterns*) qui sont essentiels à la survie des micro-organismes (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006). Des molécules associées au virus, telles que l'ADN, l'ARNsb et l'ARNdb produites lors d'une infection virale sont reconnues par les PRRs (figure 3) qui vont initier une réponse antivirale appropriée qui comprend entre autre, la production de cytokines et l'induction d'une réponse immunitaire inflammatoire et adaptative (Kawai and Akira 2006). Parmi les PRRs, trois classes de récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance de composantes spécifiques aux virus par les cellules du système immunitaire inné : les récepteurs TLRs, les récepteurs du gène inducible par l'acide rétinoïque ou RLRs (pour *Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors*) et les récepteurs de domaines d'oligomérisation et de liaison aux nucléotides ou NLRs (pour *nucleotide oligomerization domain (Nod-like receptors)*) (Takeuchi and Akira 2007).

À ce jour, 10 TLRs ont été identifiés chez l'homme (Takeuchi and Akira 2007). Les TLRs sont exprimés sur plusieurs cellules du système immunitaire dont les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B (LyB), certains types de LyT, de même que sur des cellules non immunes, tels les fibroblastes et les cellules épithéliales (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006). Parmi les membres de la famille des TLRs, les TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8 et TLR-9 sont impliqués dans la reconnaissance des virus (Takeuchi and Akira 2009). Les TLR-2 et 4, présents sur la membrane plasmique, sont impliqués dans la reconnaissance de certaines protéines d'enveloppe virales (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006). Le TLR-2 est activé par l'hémagglutinine du virus de la rougeole (Bieback et al. 2002), de même que par le cytomégalovirus humain (CMV) et le virus de l'herpès simplex de type 1 (VHS-1) (Kurt-Jones et al. 2004; Compton et al. 2003). Le TLR-4, quant à lui, est activé par la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (Kurt-Jones et al. 2000). Les TLRs 3, 7, 8 et 9 sont impliqués dans la

reconnaissance de nucléotides viraux et sont présents exclusivement sur des vésicules cytoplasmiques (Kawai and Akira 2006), à l'exception du TLR-3 qui est également exprimé à la surface des fibroblastes (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006). Le TLR-3 permet la reconnaissance de l'ARNdb qui est produit par plusieurs virus lors de leur réplication (Alexopoulou et al. 2001). L'ARNsb viral est quant à lui reconnu par les TLR-7 et 8 (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004) et finalement le TLR-9 est activé par l'ADN non méthylé contenant des motifs CpG qui sont présents dans les ADN viraux et bactériens (Kawai and Akira 2006; Hemmi et al. 2000). À la suite de la reconnaissance des ligands par les TLRs, il y a activation d'une cascade de signalisation intracellulaire via des molécules adaptatrices qui vont mener à l'induction de gènes impliqués dans la défense de l'hôte comme des cytokines pro-inflammatoires et les IFNs de type 1 (voir section 2.2) (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006).

Les RLRs comprennent RIG-I (décrit précédemment à la section 1.3) et MDA-5 (pour *melanoma differentiation-associated gene 5*), des protéines cytoplasmiques dont l'expression est fortement induite par les IFNs et qui interagissent avec l'ARNdb (Takeuchi and Akira 2007). Ces protéines vont induire des cascades de signalisation via la protéine adaptatrice IPS-1 (pour *IFN- $\beta$  promotor stimulator-1*) qui vont mener, comme lors de l'activation des TLRs, à la production d'IFNs de type 1 et de cytokines pro-inflammatoires (Takeuchi and Akira 2007).

Finalement, chez l'humain, les membres de la famille des NLRs comprennent 23 protéines cytosoliques qui sont principalement impliquées dans la reconnaissance de bactéries (Inohara et al. 2005). Par contre, un des membre de cette famille, Nalp3 (aussi appelé cryoporine) serait également impliqué dans la reconnaissance d'infections virales et de l'ARNdb (Kanneganti et al. 2006). L'activation de Nalp3 mène à la formation d'un complexe appelé « l'inflammasome » qui contient, entre autres, la caspase-1. La caspase-1 permet le clivage des formes inactives de certaines cytokines pro-inflammatoires (par exemple l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18) en leurs formes matures et actives (Kawai and Akira 2009).

## 2.2 LES INTERFÉRONS DE TYPE 1

Les IFNs de type 1 ont été découverts en 1957 et leur nom provient du fait que leur rôle principal est « d'interférer » avec la réplication virale (Isaacs and Lindenmann 1957). Chez l'humain, les IFNs de type 1 comprennent plusieurs sous-types d'IFN- $\alpha$ , un seul IFN- $\beta$  de même que les IFNs- $\omega$ , - $\epsilon$  et - $\kappa$  (Stark et al. 1998; Roberts, Liu, and Alexenko 1997). Toutes les cellules nucléées sont capables de synthétiser et sécréter des IFNs de type 1 en réponse à une infection virale par contre les CD<sup>+</sup> et plus particulièrement les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCDs) sont les principales cellules productrices d'IFNs de type 1 (Thimme, Lohmann, and Weber 2006). Différents senseurs de l'immunité innée, dont certains TLRs et les RLRs, sont capables de détecter la présence d'un virus dans les cellules infectées et l'activation de ces récepteurs peut mener à la production d'IFNs de type 1 (voir la section 2.1). Les IFNs sécrétés activent le récepteur de l'IFN- $\alpha$  (IFNAR) de manière autocrine et paracrine (Uematsu and Akira 2007) ce qui mène à la transcription de plus de 300 gènes, appelés gènes stimulés par l'interféron ou ISGs (pour *interferon stimulated genes*) qui ont des fonctions antivirales, anti-prolifératives et immunomodulatrices (Thimme, Lohmann, and Weber 2006). Les IFNs de type 1 ont donc un rôle primordial dans l'établissement de la réponse immunitaire innée tout en étant également impliqués dans le développement subséquent de la réponse immunitaire adaptative aux virus (Uematsu and Akira 2007). En effet, les IFNs- $\alpha/\beta$  peuvent induire la maturation des CD<sup>+</sup> permettant ainsi le développement des réponses cellulaires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, la prolifération et la survie des LyT, l'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK (pour *natural killer*), le développement des macrophages et la réponse humorale (pour une revue de littérature complète voir (Theofilopoulos et al. 2005)).

### 3. LES CELLULES DENDRITIQUES : LE LIEN ENTRE LES RÉPONSES IMMUNITAIRES INNÉE ET ADAPTATIVE

#### 3.1 ORIGINE, POPULATIONS ET RÔLE GÉNÉRAL DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

Les CD<sub>s</sub> sont des cellules du système immunitaire inné spécialisées dans la capture, le transport, l'apprêtement et la présentation d'antigènes aux LyT (Shortman and Liu 2002). D'abord identifiées en 1868 (cellules de Langerhans (CLs) dans la peau), leur capacité à stimuler les LyT n'a été démontrée qu'à la fin des années 70 (Steinman and Witmer 1978). Les CD<sub>s</sub> proviennent de la moelle osseuse (cellules progénitrices hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>) (Caux et al. 1996; Young, Szabolcs, and Moore 1995). Les cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> myéloïdes se différencient en monocytes (précurseurs des CD<sub>s</sub> CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> dans le sang) qui peuvent donner naissance aux CD<sub>s</sub> myéloïdes (CD11c<sup>+</sup> CD123<sup>lo</sup>) en présence de GM-CSF (pour *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) et d'interleukine-4 (IL-4) (Zhou and Tedder 1996; Romani et al. 1994). Les progéniteurs myéloïdes peuvent également se différencier en précurseurs CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> et générer les CLs en présence de GM-CSF, d'IL-4 et de TGF-β (pour *transforming growth factor*) (Ito et al. 1999). Les pCD<sub>s</sub>, quant à elles, pourraient provenir des cellules progénitrices lymphoïdes CD34<sup>+</sup> (LeibundGut-Landmann et al. 2004) qui génèrent des précurseurs des CD<sub>s</sub> dans le sang qui sont CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> et IL3Rα<sup>+</sup> et qui, en présence d'IL-3, vont donner les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Cella et al. 1999; Olweus et al. 1997). Outre leur origine, de nombreuses différences existent entre les CD<sub>s</sub> myéloïdes et plasmacytoïdes : l'expression de marqueurs à leur surface, les récepteurs qu'elles possèdent, leur distribution anatomique, leur production de cytokines et leurs fonctions (Adams, O'Neill, and Bhardwaj 2005; Shortman and Liu 2002). Les CD<sub>s</sub> myéloïdes expriment les TLRs 2, 3, 4 et 8 tandis que les CD<sub>s</sub> plasmacytoïdes expriment uniquement les TLRs 7 et 9 (Shortman and Liu 2002). À moins d'avis contraire, la présente section traitera principalement des CD<sub>s</sub> myéloïdes humaines.

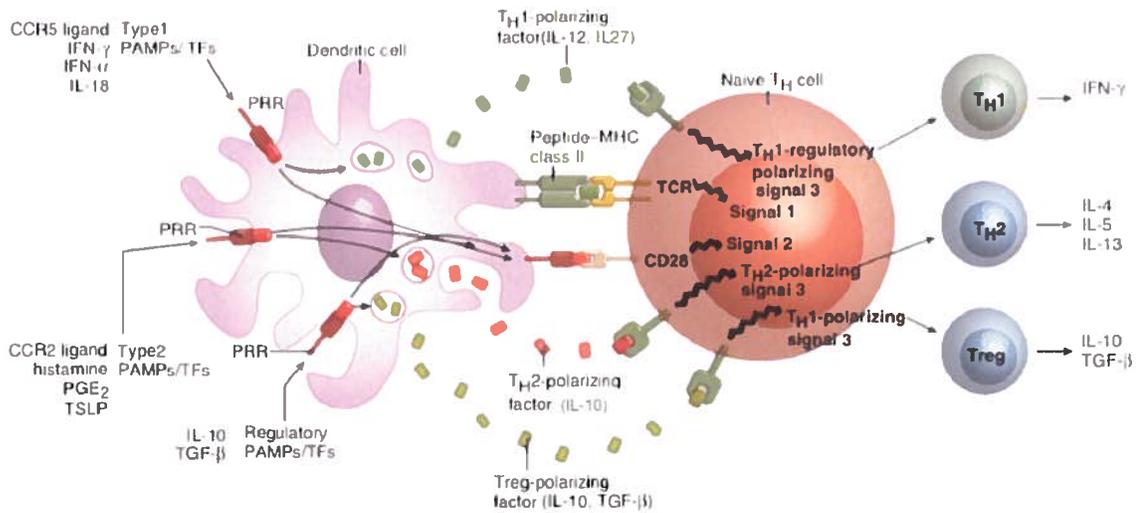
Les CD<sub>s</sub> sont les seules cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) (qui comprend outre les CD<sub>s</sub>, les macrophages et les LyB) capables de stimuler les LyT naïfs. Par contre, cette capacité n'est pas constitutive. Dans les années 80, l'équipe de Schuler a démontré que

des CLs fraîchement isolées étaient de faibles stimulatrices des LyT tandis que ces mêmes cellules cultivées *in vitro* possédaient une meilleure capacité à induire la prolifération des LyT (Schuler and Steinman 1985). Par ailleurs, les travaux de Romani ont démontré que des CLs cultivées *in vitro* étaient moins efficaces que les CLs fraîches à apprêter des antigènes (Romani et al. 1989). Ces observations ont mené au concept que les CD existents sous deux formes : les CD immatures (imCDs) dont le rôle est de patrouiller le sang et les tissus pour capturer et apprêter les antigènes, et les CD matures (mCDs) qui sont capables d'induire la prolifération des LyT et qui permettent donc le développement de la réponse immunitaire adaptative.

### **3.2 CAPTURE ET APPRÊTEMENT DES ANTIGÈNES PAR LES CELLULES DENDRITIQUES IMMATURES**

Les imCDs sont localisées dans la plupart des tissus périphériques, dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes où elles capturent des antigènes du soi et du non-soi (Guermonprez et al. 2002). En réponse à la production de chimiokines suivant une inflammation locale, les précurseurs des CD migrent rapidement au site inflammé. Les imCDs expriment d'ailleurs plusieurs récepteurs de chimiokines (figure 3) tels que CCR1, CCR2 et CCR5 (Banchereau et al. 2000). La capture d'antigènes par les imCDs peut se faire par macropinocytose, phagocytose ou endocytose par récepteurs (Banchereau et al. 2000). La macropinocytose représente un moyen rapide et non spécifique d'échantillonner une large quantité de fluides présents dans l'environnement de la cellule (Guermonprez et al. 2002). La phagocytose est généralement initiée par l'engagement d'un récepteur à la surface des imCDs et elle permet l'internalisation de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Albert et al. 1998; Rubartelli, Poggi, and Zocchi 1997), de virus, de pratiquement toutes les bactéries, de même que des parasites intracellulaires (Guermonprez et al. 2002). Finalement, un nombre important de récepteurs endocytaires sont exprimés par les imCDs : les récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines (FcR) permettent l'endocytose de complexes immuns ou de particules opsonisées (Fanger et al. 1996), les récepteurs du complément CR3 et CR4 (Reis e Sousa, Stahl, and Austyn 1993), les récepteurs « scavenger » (Platt, da Silva, and Gordon 1998), de même que plusieurs lectines de type C (*i.e.* récepteur du mannose et DEC-205) (Engering et al.

1997; Jiang et al. 1995). Les imCDs sont donc bien équipées pour échantillonner leur environnement, mais sont de faibles stimulatrices des LyT puisque la majeure partie des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont retenues à l'intérieur des CD et qu'elles expriment peu les molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) nécessaires à l'activation des LyT naïfs (voir point 3.3 de la présente section) (Adams, O'Neill, and Bhardwaj 2005).



**Figure 3 : Interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T naïfs. Représentation de différents récepteurs (PRR) exprimés à la surface des cellules dendritiques impliqués dans la reconnaissance de pathogènes. Signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T et impliqués dans la polarisation de la réponse T<sub>H</sub>.**

Adapté de Clark and Kupper 2005.

### 3.3 PROCESSUS DE MATURATION ET FONCTIONS DES CELLULES DENDRITIQUES MATURES

Afin de devenir des cellules efficaces pour la stimulation des LyT, les CD doivent subir un processus complexe de maturation. Ce processus s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette, d'une diminution de l'activité phagocytaire et d'une migration vers les organes lymphoïdes ou les ganglions lymphatiques où elles induiront le développement de la réponse immunitaire adaptative (Adams, O'Neill, and Bhardwaj 2005). Le signal de maturation des imCDs peut être de deux types : reconnaissance directe du « danger » (pathogènes, inflammation ou dommage aux tissus) par des récepteurs exprimés à la surface des imCDs et/ou la reconnaissance indirecte via les cytokines inflammatoires de

l'environnement (Guermonprez et al. 2002). Parmi les récepteurs qui permettent la reconnaissance directe, il y a les TLRs (voir point 2.1 de la présente section) qui permettent la détection de virus et bactéries. L'engagement des FcR par des complexes immuns ou des anticorps spécifiques permet également d'induire la maturation des imDCs (Geissmann et al. 2001). La mort cellulaire, tant par nécrose que par apoptose, engendrerait également la maturation des CDs (Sauter et al. 2000; Rovere et al. 1998). Différents ligands, présents sur les LyT CD4<sup>+</sup> peuvent induire la maturation des CDs : CD40L, FasL et OX40 (Rescigno et al. 2000; Ohshima et al. 1997; Caux et al. 1994). Finalement, la présence de cytokines inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  (pour *tumor necrosis factor*), l'IL-1 $\beta$  ou encore la prostaglandine E2 (PGE-2), dont la sécrétion est induite par la présence de pathogènes est détectée par les imCDs via les récepteurs de cytokines et permet la reconnaissance indirecte du danger qui déclenche le processus de maturation (Banchereau et al. 2000).

L'internalisation d'antigènes est une caractéristique spécifique aux imCDs. Ainsi, durant la maturation, les CDs vont diminuer leur activité phagocytaire par différentes voies. Tout d'abord, l'expression à la surface des CDs des différents récepteurs responsables de la capture d'antigènes par endocytose décrits précédemment est diminuée. De plus, la phagocytose et la macropinocytose sont également régulées à la baisse (Guermonprez et al. 2002).

Le processus de maturation déclenche également la migration des CDs (qui, au stade immature, se trouvent en périphérie) vers les tissus lymphoïdes (tels que la rate et les ganglions lymphatiques). La migration est due, du moins en partie, à la modification de l'expression de certains récepteurs de chimiokines : diminution de l'expression de CCR1, CCR2 et CCR5 (dont les ligands sont produits aux sites d'inflammation) et augmentation de CCR7, qui cible les CDs vers les vaisseaux et les ganglions lymphatiques via les chimiokines CCL19 et CCL21 (Sallusto et al. 1998). Puisque ces deux chimiokines peuvent attirer les mCDs, mais également les LyT (Gunn et al. 1998), elles ont donc un rôle à jouer dans la rencontre des CDs et des LyT au niveau des tissus lymphoïdes.

La maturation permet également l'augmentation de l'expression à la surface des mCDs, des différentes molécules impliquées dans l'interaction entre les mCDs et les LyT. Après la capture de l'antigène, les CDs l'apprêtent en peptides qui sont chargés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La maturation induit donc l'augmentation de l'expression à la surface des mCDs de complexes CMH-peptides (pCMH) qui sont reconnus par le récepteur des LyT (appelé TCR pour *T-cell receptor*) et qui représentent le premier signal dans l'activation des LyT spécifiques à l'antigène (Banchereau et al. 2000). Il y a également augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et de co-stimulation (CD80, CD86, CD83 et CD40). Ces molécules vont interagir avec des récepteurs exprimés à la surface des LyT (figure 3) et vont permettre une communication à double sens entre les CDs et les LyT. Le second signal d'activation des LyT (figure 3) est donné par la liaison entre CD80/CD86 (également appelées B7.1/B7.2) et leur ligand CD28 exprimé sur les LyT (Reis e Sousa 2006; Adams, O'Neill, and Bhardwaj 2005; Banchereau et al. 2000). Les molécules CD80/CD86 lient le CD28, mais peuvent également lier CTLA-4 exprimé sur les LyT (Lenschow, Walunas, and Bluestone 1996). L'engagement du CD28 avec ses ligands exprimés sur les mCDs permet l'activation des LyT, tandis que la liaison de CD80/CD86 avec CTLA-4 (qui a une plus forte affinité que CD28 pour CD80/CD86) est impliquée dans l'arrêt de la réponse T et dans l'induction de la tolérance (Vandenborre et al. 1999; Perez et al. 1997). Le rôle de CD83 est encore mal connu et l'existence de son ligand sur les LyT est encore controversée, mais puisqu'il est exprimé uniquement sur les mCDs il pourrait avoir un rôle à jouer dans l'activation des LyT. D'ailleurs, une étude semble indiquer qu'il serait impliqué dans l'expansion des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) nouvellement activés de même que dans leur survie (Hirano et al. 2006). Par ailleurs, il a été démontré que l'interaction entre le CD40 et son ligand (CD40L), exprimé à la surface des LyT CD4<sup>+</sup>, pouvait rendre les CDs aptes à stimuler les CTLs (Bennett et al. 1998). Finalement, tel que mentionné précédemment, la liaison du CD40L au CD40 exprimé sur les CDs est suffisante pour induire la maturation des CDs, augmentant l'expression des molécules CD80/CD86 et le relâchement de cytokines (Caux et al. 1994).

Ainsi, le processus de maturation est un processus complexe et hautement régulé, qui permet de transformer les imCDs spécialisées dans la capture d'antigènes en périphérie, mais qui sont de faibles stimulatrices des LyT, en mCDs qui possèdent les caractéristiques nécessaires à l'induction de la prolifération des LyT dans les organes lymphoïdes et les ganglions lymphatiques.

#### **4. INDUCTION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE ADAPTATIVE PAR LES CELLULES DENDRITIQUES**

L'apprêtement des antigènes capturés par les imCDs est régulé par la maturation des CDs. À la suite de la capture de l'antigène, les CDs vont l'apprêter en peptides qui sont ensuite chargés sur les molécules du CMH de classe I ou II (CMH-I ou CMH-II). Ces complexes pCMH sont ensuite transportés à la surface des CDs pour la reconnaissance par des LyT qui sont spécifiques à l'antigène, menant ainsi à l'induction de la réponse immunitaire adaptative de type cellulaire. En effet, les LyT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> ne peuvent reconnaître leurs antigènes spécifiques que si ces derniers sont dégradés en peptides et présentés sous forme de peptides associés aux molécules de CMH-I et II respectivement (Zinkernagel and Doherty 1974; Shevach and Rosenthal 1973).

##### **4.1 PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE VIA LE CMH-I : INDUCTION DE LA RÉPONSE T CD8<sup>+</sup>**

Afin d'induire une réponse cellulaire de type cytotoxique qui permet l'élimination par les CTLs des cellules infectées, les CDs doivent présenter les antigènes sous forme de peptides associés au CMH-I aux LyT CD8<sup>+</sup>. Le CMH-I est présent à la surface de toutes les cellules nucléées. Normalement, les antigènes endogènes (synthétisés à l'intérieur des cellules) sont présentés via le CMH-I aux LyT CD8<sup>+</sup> (voie d'apprêtement cytosolique), mais il arrive également que des antigènes de nature exogène soient présentés par le CMH-I, un processus appelé présentation croisée (Bevan, Langman, and Cohn 1976). À la suite de l'ubiquitinylation, les antigènes présents au niveau du cytosol sont d'abord dégradés en peptides dans le protéasome. Ces peptides sont ensuite transportés au réticulum endoplasmique (RE) par des molécules transporteuses TAP (pour *transporters*

*for antigen presentation*) transmembranaires pour être chargés sur les molécules du CMH-I. Ce chargement se fait sous le contrôle de plusieurs molécules chaperonnes, telles que la calnexine, la calréticuline et la tapasine. Une fois les complexes pCMH-I assemblés, ils sont transportés à la membrane plasmique via l'appareil de Golgi pour la présentation aux LyT CD8<sup>+</sup> spécifiques pour le complexe pCMH-I (Cresswell et al. 1999; Pamer and Cresswell 1998). Le TCR et le co-récepteur CD8 présents à la surface des LyT CD8<sup>+</sup> vont donc reconnaître le complexe présenté à la surface des CDs et la présence des molécules de co-stimulation CD80/CD86 va permettre l'activation complète des LyT CD8<sup>+</sup>. Une fois activés, ces derniers vont éliminer les cellules infectées, soit par la voie perforine-granzyme (élimination directe des cellules infectées qui présentent le complexe pCMH-I), soit par l'induction de l'apoptose dans les cellules infectées par la liaison de FasL (exprimé sur les LyT CD8<sup>+</sup>) au Fas (sur la cellule infectée) (Kagi et al. 1994). Les CTLs peuvent également produire des cytokines antivirales (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) qui permettent de bloquer la réplication virale (Guidotti and Chisari 2001).

#### **4.2 PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE VIA LE CMH-II: INDUCTION DE LA RÉPONSE T CD4<sup>+</sup>**

Les antigènes exogènes sont, quant à eux, présentés via le CMH-II aux LyT CD4<sup>+</sup> (voie d'apprêtement endocytaire). Les imCDs accumulent de nombreuses molécules de CMH-II dans des compartiments intracellulaires (Nijman et al. 1995). Une fois capturés par les CDs, les antigènes sont dégradés en peptides dans les endosomes qui vont fusionner avec les compartiments riches en CMH-II. La présence de protéases (notamment de la famille des cathepsines) permet la dégradation de la chaîne invariante Ii, qui protège la niche peptidique du CMH-II (Villadangos et al. 1999). Ii est clivée entre autres par la cathepsine S qui, chez les imCDs, est inhibée par la cystatine C; à la suite de la maturation des CDs, la cystatine C est régulée à la baisse, ce qui augmente l'activité de la cathepsine S (Pierre and Mellman 1998). Finalement, la liaison entre le peptide et le CMH-II est sous le contrôle des molécules HLA-DM (qui aide au chargement du peptide) et HLA-DO (qui peut inhiber le chargement) (Kropshofer, Hammerling, and Vogt 1999). Les complexes pCMH-II vont ensuite être transportés à la surface cellulaire pour la présentation aux LyT CD4<sup>+</sup>. Ces derniers vont reconnaître le complexe pCMH-II via leur

TCR (qui est spécifique au complexe pCMH-II) et le co-récepteur CD4. Les molécules de co-stimulation CD80/CD86 à la surface des CD vont également interagir avec CD28 exprimé sur les LyT CD4<sup>+</sup> pour permettre l'activation complète de ces derniers. Les LyT CD4<sup>+</sup> sont également appelés lymphocytes T auxiliaires ou T<sub>H</sub> (pour *T helper*) et selon, les cytokines produites par les CD (voir point 4.3 de la présente section), vont se différencier en T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> ou T<sub>REG</sub> (pour LyT régulateurs). Ces sous-populations de T<sub>H</sub> vont activer différentes populations du système immunitaire. Les T<sub>H1</sub> vont produire majoritairement de l'IFN- $\gamma$  (figure 3), ce qui mène à l'activation des macrophages et des CTLs favorisant ainsi la réponse cellulaire. Les T<sub>H2</sub>, quant à eux, vont produire de l'IL-4, IL-5 et IL-13 ce qui aide à la réponse humorale (production d'anticorps par les LyB). Les T<sub>REG</sub> produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  qui inhibent fortement les réponses T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub>. Finalement, les T<sub>H17</sub> font également partie des T<sub>H</sub> et pourraient contribuer à l'élimination de certains pathogènes tout en étant impliqués dans les processus d'autoimmunité (pour une revue complète de littérature voir (Zhou, Chong, and Littman 2009)).

### **4.3 POLARISATION DE LA RÉPONSE T AUXILIAIRE PAR LES CELLULES DENDRITIQUES**

En plus d'être impliquées dans l'activation des LyT, les CD fournissent un troisième signal (figure 3), par la production de cytokines ou autres molécules, qui polarise la réponse T<sub>H</sub>. Ainsi, par la production principalement d'IL-12 (Macatonia et al. 1995), mais également d'IL-23, d'IL-27, d'IFNs type I et de la molécule d'adhésion ICAM-1, les CD vont polariser la réponse T<sub>H</sub> vers un type T<sub>H1</sub> qui permet l'induction de la réponse cellulaire contre des pathogènes intracellulaires (Kapsenberg 2003; Dong and Flavell 2000). Par la production d'IL-4 (Swain et al. 1990), mais également de MCP1 et d'OX40L, elles vont plutôt polariser la réponse vers un type T<sub>H2</sub> qui permet l'élimination de plusieurs pathogènes extracellulaires via l'induction de la réponse humorale et donc la production d'anticorps (Kapsenberg 2003). En sécrétant de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , les CD vont induire une réponse T<sub>REG</sub> (Zeller et al. 1999). Le type de cytokines produites par les CD dépend de différents facteurs, tels que le type et la localisation des CD, l'environnement local et la nature du stimuli de maturation (Adams, O'Neill, and Bhardwaj 2005; Kapsenberg 2003).

#### 4.4 INHIBITION DES FONCTIONS DES CELLULES DENDRITIQUES PAR LES VIRUS

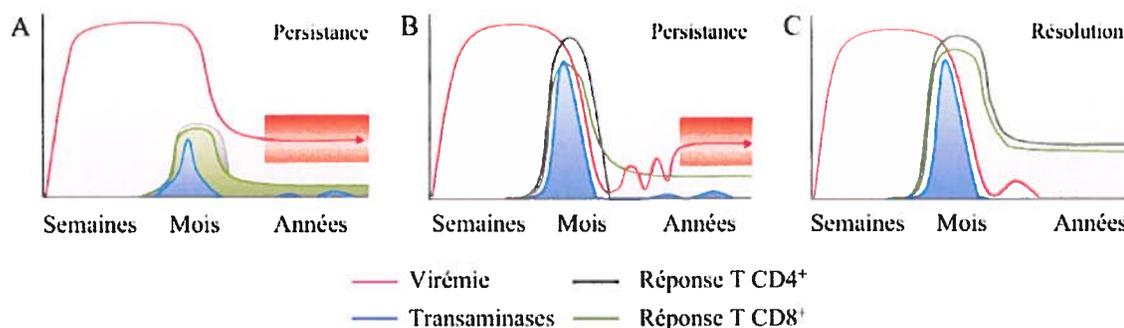
Étant donné l'importance de la réponse immunitaire cellulaire dans l'élimination de plusieurs infections virales et puisque les CD sont responsables de l'induction de cette réponse, il n'est pas surprenant de constater que plusieurs virus ont développé des stratégies pour inhiber les différentes étapes de la présentation antigénique (Tortorella et al. 2000). Toutes les étapes du processus d'apprêtement/présentation des antigènes, de même que les mécanismes impliqués dans la maturation des CD peuvent être ciblés par les virus. La présente section ne traitera que de quelques exemples. Tout d'abord, la génération des CD, de même que leur survie et leur maturation peuvent être affectées par différents virus. C'est le cas de certains poxvirus, tels le virus de la vaccine et le virus du molluscum contagiosum et de virus de la famille herpès, tels que le virus d'Epstein-Barr, le CMV humain et les virus herpès-6, 7 et 8, qui affectent les progéniteurs des CD ou qui diminuent l'attraction des CD au site d'infection (McFadden and Murphy 2000; Tortorella et al. 2000). Le virus de la vaccine peut également inhiber la maturation des CD et induire leur mort par apoptose (Engelmayer et al. 1999). Certains virus interfèrent avec les processus d'apprêtement des antigènes et de leur présentation sous forme de complexes pCMH à la surface des CD. Les virus VHS-1 et VHS-2, de même que le CMV humain, sont capables respectivement d'empêcher le transport vers le RE des peptides antigéniques dégradés dans le protéasome (York et al. 1994) et de diminuer l'expression du CMH-I à la surface des CD en retenant ces derniers au RE (Jones et al. 1996). Par ailleurs, plusieurs virus peuvent inhiber l'action des cytokines produites par les CD. Le virus de la rougeole inhibe la production d'IL-12 par les CD (Karp 1999), tandis que de nombreux autres virus sécrètent des récepteurs solubles pour différentes cytokines, empêchant ces dernières de jouer leur rôle immunomodulateur (Spriggs 1996). Finalement, certains virus sont capables, du moins *in vitro*, d'infecter les CD : le virus de l'immunodéficience humaine, le virus de la rougeole, le virus influenza et le virus de la dengue (Kaiserlian and Dubois 2001).

## **5. RÉPONSE IMMUNITAIRE LORS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HÉPATITE C**

### **5.1 IMPORTANCE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE CELLULAIRE**

Tel que mentionné précédemment, près de 80% des patients infectés par le VHC vont développer une infection chronique. L'étude des réponses immunitaires générées lors de la phase aiguë de l'infection par le VHC (qui correspond aux 6 premiers mois de l'infection) a été compliquée par le fait que dans la majorité des cas, l'infection est asymptomatique et la phase aiguë passe donc inaperçue. Ainsi, la plupart des données obtenues proviennent soit d'études faites chez le chimpanzé, soit de cohortes de gens à risque de contracter le virus. À la suite de l'infection, l'ARN viral apparaît rapidement (en quelques jours) dans le sérum et atteint un maximum entre 6 à 10 semaines après l'infection et ce, peu importe l'issue de l'infection (Bowen and Walker 2005). En ce qui concerne la réponse immunitaire innée, il semble que le VHC induise les IFNs de type I au niveau du foie chez les chimpanzés infectés, mais encore une fois, sans lien apparent entre l'élimination ou la persistance du virus (Bigger et al. 2004; Thimme et al. 2002). La comparaison des réponses immunitaires adaptatives générées chez les patients qui parviennent à éliminer le virus par rapport à celles observées chez les patients qui vont développer une infection chronique a permis de conclure qu'une réponse cellulaire ( $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) efficace est requise pour l'élimination du virus dans la phase aiguë de l'infection (Shoukry et al. 2003; Thimme et al. 2001; Lechner et al. 2000). La réponse cellulaire apparaît plusieurs semaines après le début de l'infection et corrèle avec l'apparition d'enzymes hépatiques dans le sang (Thimme et al. 2001) qui sont libérées par les hépatocytes endommagés (figure 4). Ces données suggèrent une immunopathologie (Thimme et al. 2001), quoique ce concept n'a pu être encore entièrement prouvé puisque certaines études n'ont pu démontrer de lien entre la réponse cellulaire et le degré de dommage au foie (Rehermann et al. 1996). De manière générale, en terme de réponse cellulaire, trois scénarios sont possibles (Bowen and Walker 2005; Gerlach et al. 1999). Chez les patients qui contrôlent peu ou pas la virémie (et qui vont développer une infection chronique), les réponses T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  sont faibles et parfois complètement absentes. La fréquence de LyT  $CD4^+$  et  $CD8^+$  spécifiques au virus dans le sang est faible

et ces cellules ciblent peu d'épitopes viraux (figure 4A) (Lauer et al. 2004; Thimme et al. 2002; Missale et al. 1996).



**Figure 4 : Représentation des réponses immunitaires cellulaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> induites lors de la phase aiguë de l'infection par le virus de l'hépatite C et qui sont responsables de l'évolution de l'infection vers la persistance (A et B) ou de la résolution de l'infection (C).**

Adapté de Bowen and Walker 2005.

Chez d'autres patients, la virémie peut d'abord être partiellement contrôlée avant de rebondir. Dans ce cas, il est possible que la réponse T CD8<sup>+</sup> soit forte et semblable à celle observée chez les patients qui éliminent le virus (Thimme et al. 2001). Par contre, il a été démontré que ces cellules ne sont pas toujours fonctionnelles (production limitée de cytokines, diminution de leur activité cytotoxique) (Wedemeyer et al. 2002). De plus, dans le cas d'une infection partiellement contrôlée, la réponse T CD4<sup>+</sup> est perdue, ce qui est généralement un signe que l'infection va persister (figure 4B) (Gerlach et al. 1999). Les individus qui parviennent à éliminer le virus génèrent quant à eux des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui sont vigoureuses, multi-spécifiques (ciblent plusieurs épitopes viraux dans les protéines structurales et non-structurales) et soutenues dans le temps (figure 4C) (Lechner et al. 2000; Cooper et al. 1999). Il est à noter que les LyT CD8<sup>+</sup> spécifiques au virus peuvent demeurer présents même chez les patients pour qui l'infection a évolué vers la chronicité (Wong et al. 1998; Koziel et al. 1992). Cependant, l'absence ou la perte des LyT CD4<sup>+</sup> durant la phase aiguë mènent à l'infection persistante, ce qui démontre le rôle crucial de ces cellules dans l'établissement d'une réponse CD8<sup>+</sup> efficace pour éliminer le VHC. En ce qui concerne la réponse T mémoire, elle ne semble pas conférer une

protection lors d'une réinfection, par contre, elle pourrait diminuer significativement le risque de développer une infection persistante (Major et al. 2002; Mehta et al. 2002).

Par ailleurs, il a été observé que, chez les patients infectés de façon chronique, il y a souvent épuisement des LyT CD8<sup>+</sup> spécifiques au virus (diminution de la production de cytokines anti-virales et de l'activité cytolytique). Il semble que cet épuisement corrèle avec une augmentation de l'expression sur ces LyT de PD-1 (pour *programmed death 1*), un récepteur inhibiteur de la famille CD28/CTLA-4 (Nakamoto et al. 2008; Golden-Mason et al. 2007; Penna et al. 2007; Radziewicz et al. 2007). En effet, l'expression de PD-1 en début d'infection sur les LyT spécifiques au virus est plus forte chez les patients qui vont développer une infection chronique que chez les patients qui parviennent à éliminer le virus (Rutebemberwa et al. 2008). Certaines de ces études ont également démontré que les LyT épuisés pouvaient retrouver leurs fonctions anti-virales lorsqu'ils étaient traités *in vitro* de manière à bloquer l'interaction entre PD-1 et PD-L1 (un des ligands de PD-1), ce qui pourrait ouvrir la voie à un éventuel traitement permettant la restauration de la fonction des LyT spécifiques au VHC qui sont non fonctionnels lors de l'infection (Nakamoto et al. 2008; Golden-Mason et al. 2007; Penna et al. 2007; Radziewicz et al. 2007).

Finalement, en ce qui concerne la réponse humorale, son rôle dans l'élimination du VHC n'est pas encore complètement connu. Une étude a démontré qu'elle n'aurait pas un rôle important à jouer dans le contrôle de l'infection puisque l'élimination du virus peut avoir lieu en absence de séroconversion chez les patients (Post et al. 2004). D'autres ont quant à eux observé qu'il n'y avait pas de corrélation entre la présence d'anticorps et l'élimination du virus (Logvinoff et al. 2004; Steinmann et al. 2004). Cependant, des études suggèrent que l'apparition d'anticorps neutralisants (AcN) dans la phase aiguë de l'infection pourrait contribuer à éliminer le virus (Pestka et al. 2007; Zibert et al. 1997). En effet, ces études, effectuées dans une cohorte de femmes infectées accidentellement par la même souche du VHC, ont démontré que l'élimination du virus était associée à l'induction rapide d'AcN dans la phase aiguë de l'infection et que ces anticorps disparaissaient ou diminuaient en nombre une fois l'infection résolue (Pestka et al. 2007).

À l'inverse, il a été observé que les patientes qui ont développé une infection chronique n'avaient soit pas, soit de faibles titres en AcN dans la phase aiguë de l'infection, alors que dans la phase tardive de l'infection il pouvait y avoir induction d'AcN (Pestka et al. 2007). Puisqu'il avait préalablement été observé dans cette même cohorte que la réponse cellulaire était présente chez les patientes qui ont éliminé le virus (Takaki et al. 2000) et que certaines des patientes ont éliminé le virus en absence des AcN (Pestka et al. 2007), cette étude n'a pu démontrer de façon certaine que l'élimination du virus est due uniquement à la présence d'AcN. Cependant, les auteurs suggèrent qu'une collaboration entre les deux types d'immunité, humorale et cellulaire, pourrait contribuer à éliminer le VHC (Pestka et al. 2007).

## **5.2 INTERFÉRENCE DU VIRUS DE L'HÉPATITE C AVEC LE SYSTÈME IMMUNITAIRE**

### **5.2.1 INTERFÉRENCE AVEC LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE**

Certaines protéines virales ciblent différentes étapes de la réponse immunitaire innée énumérées précédemment (voir point 2 de la présente section). Tout d'abord, le VHC semble interférer avec différentes voies de reconnaissance des virus. En effet, la protéase NS3-4A agirait sur RIG-I impliquée dans la reconnaissance de l'ARNdb. RIG-I possède deux domaines de recrutement pour la protéine adaptatrice IPS-1 (également appelée MAVS, VISA ou Cardif) qui est située à la membrane des mitochondries. La protéase virale cliverait IPS-1, qui ainsi ne se retrouve plus à la membrane mitochondriale, l'empêchant d'activer et d'induire la translocation nucléaire d'IRF-3 et prévenant ainsi l'induction des gènes permettant la production d'IFNs de type 1 (Li, Sun et al. 2005; Meylan et al. 2005). D'ailleurs, les hépatocytes infectés montrent une localisation anormale d'IPS-1 dans des biopsies de foies de patients infectés de façon chronique (Loo et al. 2006). Le VHC interférerait également avec la reconnaissance de l'ARNdb par le TLR-3 en clivant sa molécule adaptatrice TRIF via la protéase NS3-4A (Li, Foy et al. 2005). La signalisation du TLR-3 est alors bloquée, ce qui empêche l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, de même que les IRF-3 et 7 qui mènent à la production de cytokines inflammatoires et des IFNs de type 1. Par ailleurs, la voie de signalisation impliquée dans la réponse aux IFNs de type 1 serait altérée par l'infection. En effet, la protéine

structurale Core activerait un inhibiteur (SOCS-3) de la voie de signalisation JAK/STAT impliquée dans la transduction du signal à la suite de la liaison des IFNs de type 1 au récepteur IFNAR (Bode et al. 2003). De plus, plusieurs protéines qui sont induites par les interférons et qui possèdent une activité anti-virale directe contre le VHC seraient également inhibées par les protéines du virus. C'est le cas du système 2'-5' OAS (oligoadénylate synthétase)/RNaseL qui permet la dégradation des ARNs cellulaires et viraux et qui serait inhibé par la protéine virale NS5A (Taguchi et al. 2004). La protéine kinase R (PKR), de même que la protéine P56, qui bloquent la synthèse protéique en se liant à des facteurs d'initiation de la traduction, seraient quant à elles affectées par les protéines E2, NS5A, de même que par IRES dans le cas de PKR et par NS3/4A pour P56 (Gale and Foy 2005; Vyas, Elia, and Clemens 2003; Taylor et al. 1999; Gale et al. 1998).

### **5.2.2 LES CELLULES DENDRITIQUES CHEZ LES PATIENTS INFECTÉS DE FAÇON CHRONIQUE**

Le(s) mécanisme(s) responsable(s) de l'incapacité de certains individus à générer une réponse cellulaire adéquate qui permet l'élimination du VHC demeure(nt) inconnu(s) et plusieurs hypothèses ont été émises, dont celle selon laquelle le virus pourrait interférer directement avec les fonctions des CD, nécessaires à l'établissement de la réponse immunitaire cellulaire adaptative. Puisque les CD sont les CPAs les plus efficaces et qu'elles sont les seules capables d'activer les LyT naïfs, plusieurs équipes ont soupçonné un défaut dans le mécanisme de présentation antigénique et se sont donc penchées sur l'état des CD chez des patients en phase chronique d'infection. Les résultats obtenus sont contradictoires, certaines études démontrant un effet de l'infection sur la fonctionnalité des CD tandis que d'autres n'ont pu montrer que les CD étaient affectées. Tout d'abord, en ce qui concerne la fréquence des CD circulantes chez les patients infectés de façon chronique, le nombre de CD myéloïdes et plasmacytoïdes peut être significativement diminué par rapport à celui observé chez des sujets sains (Rodrigue-Gervais et al. 2007; Dolganiuc et al. 2006; Kanto et al. 2004; Wertheimer, Bakke, and Rosen 2004). Par contre, ce phénomène n'est pas toujours observé (Yonkers et al. 2007; Piccioli et al. 2005) et la réduction du nombre de CD circulantes pourrait être expliquée, du moins en partie, par leur redirection vers le foie (Wertheimer, Bakke, and Rosen 2004). Le

processus de maturation des CD4 pourrait également être affecté chez les CD4. En effet, certaines équipes ont démontré que des MoCD4, des CD4 myéloïdes et plasmacytoïdes isolées chez des patients infectés et stimulées *in vitro* pour induire leur maturation exprimaient significativement moins les marqueurs d'activation et de co-stimulation comparativement à des donneurs sains (Auffermann-Gretzinger, Keeffe, and Levy 2001; Yonkers et al. 2007). De plus, la production de cytokines pro-inflammatoires (*i.e.* IL-12p70, TNF- $\alpha$  ou IFN- $\alpha$ ) par ces cellules serait diminuée (Kanto et al. 2004; Rodrigue-Gervais et al. 2007; Kanto et al. 1999; Dolganiuc et al. 2006). Encore une fois, d'autres études n'ont pu démontrer la réduction des marqueurs de maturation (Kanto et al. 2004; Bain et al. 2001; Yonkers et al. 2007; Albert, Decalf, and Pol 2008; Longman et al. 2004; Piccioli et al. 2005; Kanto et al. 1999) ni la diminution de la production de cytokines (Bain et al. 2001; Wertheimer, Bakke, and Rosen 2004; Albert, Decalf, and Pol 2008; Piccioli et al. 2005). Finalement, la fonction allostimulatrice (capacité à stimuler des LyT allogéniques) des CD4 pourrait être altérée chez les patients infectés de façon chronique (Bain et al. 2001; Kanto et al. 1999; Kanto et al. 2004; Auffermann-Gretzinger, Keeffe, and Levy 2001; Yonkers et al. 2007; Tsubouchi et al. 2004). D'autres équipes ont plutôt démontré que les CD4 étaient capables de stimuler de manière efficace les LyT allogéniques (Longman et al. 2004; Piccioli et al. 2005). Les résultats de ces nombreuses études sont donc très contradictoires et ne permettent pas de tirer de conclusion claire quant au rôle de l'infection par le VHC sur les CD4. De plus, elles ont été effectuées chez des patients qui sont en phase chronique d'infection et ne représentent donc pas nécessairement ce qui se passe dans la phase aiguë de l'infection, là où l'établissement de la réponse immunitaire cellulaire nécessaire à l'élimination du virus a lieu.

### **5.2.3 INFECTION DES CELLULES IMMUNITAIRES PAR LE VHC**

L'association d'ARN viral du VHC avec des cellules du système immunitaire a été rapportée à plusieurs reprises. Par contre, la possibilité que le virus puisse infecter certaines populations du système immunitaire n'a pas encore été clairement démontrée. En particulier, les LyB et les CD4 de patients infectés de façon chronique sont souvent associés à l'ARN viral (Boisvert et al. 2001; Goutagny et al. 2003), mais malgré tout dans

la plupart des études, le nombre relatif de génomes viraux associés aux cellules du système immunitaire est généralement très faible (Dustin and Rice 2007).

## **6. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA PRÉSENTE ÉTUDE**

Les mécanismes responsables de l'induction d'une réponse cellulaire qui est inadéquate pour éliminer le VHC demeurent encore inconnus et nous pouvons nous demander ce qui distingue les individus qui parviennent à éliminer le virus de ceux qui vont développer une infection persistante. Notre hypothèse de recherche était que le VHC interfère avec les fonctions des cellules du système immunitaire, plus particulièrement au niveau des CD4 puisque elles sont responsables de la présentation antigénique et de la stimulation des LyT naïfs et qu'il a été démontré par certaines équipes que ces cellules pouvaient être affectées chez les patients infectés de façon chronique. Par contre, ces études ont été faites chez des patients qui sont généralement infectés depuis plusieurs années et aucune donnée n'est disponible quant à l'état des CD4 dans la phase aiguë de l'infection, au moment où l'élaboration de la réponse cellulaire spécifique au VHC est nécessaire pour résoudre l'infection. Les objectifs de la présente étude étaient donc d'analyser l'impact du VHC sur différentes fonctions des cellules du système immunitaire, mais dans un contexte qui mime la phase aiguë de l'infection, en utilisant le système de production de virus en culture cellulaire à l'aide du clone infectieux JFH1.

**CHAPITRE 2**

**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **1. LIGNÉE CELLULAIRE**

La lignée cellulaire Huh-7.5 (gracieuseté du Dr Patrick Labonté) a été cultivée à 37 degrés Celsius (°C) dans une atmosphère à 5% CO<sub>2</sub>, dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenant 10% volume/volume (v/v) de sérum de bovin fœtal (SBF) décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes (Hyclone, Logan, UT, USA), 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen) et 100 µg de streptomycine et 100 unités de pénicilline (strep/pen) (Invitrogen).

## **2. PRODUCTION VIRALE – JFH1**

Les cellules Huh-7.5 ont été mises à une concentration de  $5 \times 10^5$  cellules totales dans des flasques pour culture cellulaire 75cm<sup>2</sup> (Corning, Corning, NY, USA) dans un volume final de 8 ml de milieu DMEM complet. Une fois les cellules adhérees, une partie du surnageant a été enlevée et du surnageant infectieux JFH1 (produit préalablement par notre laboratoire par la transfection de cellules Huh-7.5 avec le plasmide pJFH1 voir (Guevin, Lamarre, and Labonté 2009)) a été ajouté à une multiplicité d'infection (MOI) de 0.01. Les cellules ont été passées aux 3-4 jours et le surnageant infectieux a été récolté, centrifugé à 4000 rpm pendant 5 minutes (Sorvall Legend RT, Mandel) et filtré à 0.22 µm pour enlever les débris cellulaires et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

## **3. QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL PAR RT-PCR QUANTITATIF**

À différents temps post-infection (p.i.), 250 µl de surnageant infectieux ont été ajoutés à 750 µl de TRIZOL LS (Invitrogen) dans des eppendorfs. Les échantillons ont été incubés à température pièce (TP) pendant 5 minutes. Par la suite, 200 µl de chloroforme (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) ont été ajoutés, les tubes ont été agités pendant 15 secondes et laissés à TP pendant 5 minutes. Après une centrifugation à 12 000 g, à 4°C pendant 15 minutes (5415 R, Eppendorf, Hambourg, Allemagne), les phases aqueuses contenant l'ARN ont été transférées dans de nouveaux eppendorfs. Par la suite, 500 µl d'isopropanol (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés et les échantillons ont été incubés pendant

10 minutes à TP. Les eppendorfs ont été centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont été retirés avant d'ajouter 1 ml d'éthanol 75% et les eppendorfs ont été mélangés au vortex (VWR, Fontenay sous Bois, France) avant d'être centrifugés à 7 400 g, 5 minutes à 4°C. Les surnageants ont été enlevés et les culots d'ARN ont été séchés à l'air libre avant d'être resuspendus dans 11 µl d'eau traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate) (Ambion, Foster City, CA, USA).

L'ADNc a été préparé en incubant tout d'abord l'ARN à 70°C pendant 3 minutes, puis 2 minutes sur la glace. Par la suite, la rétrotranscription (RT) a été effectuée en ajoutant 4 µl de tampon pour RT 5X (Invitrogen), 2 µl de dithiothréitol (DTT) (0.1 M) (Invitrogen), 1 µl d'amorces aléatoires p(dN6) (100 ng/ml) (Invitrogen), 1 µl de dNTP (20 mM) (Invitrogen), 20 U de RNase-OUT (Invitrogen) et 100 U de transcriptase inverse MMLV (pour *Moloney murine leukemia virus*) (Invitrogen). Les échantillons ont été incubés pendant 10 minutes à 25°C, puis pendant 1 heure à 37°C. La transcriptase inverse MMLV a été inactivée par une incubation à 70°C pendant 15 minutes et l'ADNc a été dilué dans un volume final de 50 µl avec de l'eau DEPC.

Pour le PCR (Taqman), 11.125 µl d'ADNc ont été mélangés avec 13.5 µl d'un mélange contenant : 0.5 µl de la sonde FAM-UTR (12.5 µM) CCGGAATTGCCGGGAAGACTG, 0.25 µl de chacune des amorces 5'UTR-reverse : 5'-GAGTGGGTTTATCCAAGAAAG-3' et 5'UTR-forward : 5'-TCTGCGGAACCGGTGAGT-3' (90 pmole/µl) (gracieuseté du Dr Patrick Labonté) et 12.5 µl de *Taqman universal master mix 2X* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le PCR a ensuite été effectué à l'aide de l'appareil Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Leipzig, Allemagne). Le programme utilisé était le suivant : 2 minutes à 50°C puis 10 minutes à 95°C suivi de 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 60 secondes.

#### **4. DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX PAR IMMUNOFLUORESCENCE**

Les cellules Huh-7.5 ont étéensemencées dans des plateaux 96 puits à fond plat (Corning) à une concentration de  $1 \times 10^4$  cellules par puits dans un volume de 100  $\mu$ l et 24 heures plus tard, 100  $\mu$ l des dilutions en série des surnageants infectieux (en duplicata) ont été ajoutés aux cellules. L'infection s'est déroulée pendant un minimum de 3h, puis les surnageants ont été enlevés et 100  $\mu$ l de milieu DMEM complet ont été ajoutés à chaque puits. Après 72 heures, le surnageant a été retiré et 100  $\mu$ l de formaldéhyde 4% (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés. Les plateaux ont été incubés à TP à l'abri de la lumière pendant 30 minutes, puis la formaldéhyde a été enlevée et les puits ont été rincés avec du PBS (Invitrogen). Par la suite, 100  $\mu$ l de méthanol glacial ont été ajoutés pendant 5 minutes à  $-20^\circ\text{C}$  et les puits ont été rincés deux fois avec du PBS avant d'ajouter 200  $\mu$ l de tampon de blocage (5% (v/v) SBF + 10% (v/v) Triton X-100 1% dilué dans le PBS (Bio Rad, Missisauga, ON, Canada) + PBS). Après une incubation d'une heure à TP, le tampon de blocage a été enlevé, les puits lavés 2 fois avec du PBS et 40  $\mu$ l d'anticorps de lapin anti-NS5A (gracieuseté du Dr Patrick Labonté) dilué 1 :1000 dans du tampon de blocage ont été ajoutés dans chaque puits. Les plateaux ont été incubés pendant 1 heure à TP avant d'être rincés 2 fois avec du PBS, puis 100  $\mu$ l d'anticorps de chèvre anti-lapin Alexa Fluor 488 (Invitrogen) dilué 1 :2500 dans du tampon de blocage ont été ajoutés aux puits et les plateaux ont été incubés pendant 1 heure à TP à l'abri de la lumière. Les puits ont à nouveau été rincés et 100  $\mu$ l de 4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole (DAPI) 1X ont été ajoutés avant de rincer les puits à l'eau 2 fois. Les cellules ont été recouvertes de PBS et les puits ont été regardés au microscope à fluorescence afin de dénombrer les foyers infectieux.

#### **5. ÉVALUATION DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE CHEZ LES CELLULES HUH-7.5 INFECTÉES**

À différents jours p.i. (lors des passages des cellules Huh-7.5 infectées ou non), la viabilité des cellules a été analysée par le test de viabilité cellulaire « *Cell proliferation kit I (MTT)* » (Roche, Mannheim, Allemagne). Les cellules étaient mises en culture dans des

plateaux 96 puits à fond plat à une concentration de  $2.5 \times 10^4$  cellules par puits dans un volume de 100  $\mu$ l de milieu DMEM complet. Après une incubation pour la nuit à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 10  $\mu$ l/puits de sel de tétrazolium MTT ont été ajoutés et l'incubation s'est poursuivie pendant 4 heures avant l'ajout de 100  $\mu$ l/puits de tampon de solubilisation. 16 heures plus tard, la densité optique a été mesurée par spectrophotométrie (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) à 570 nm.

## 6. ÉVALUATION DE L' APOPTOSE INDUITE PAR L' INFECTION

L'apoptose induite par JFH1 chez les cellules Huh-7.5 a été mesurée par ELISA et par cytométrie en flux.

L'évaluation par ELISA a été effectuée à l'aide du kit *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>* (Roche) selon le protocole du fabricant. Les cellules infectées ou non ont été incubées à  $2 \times 10^4$  cellules/puits dans une plaque 48 puits (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) dans du milieu DMEM complet pendant 16 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les plaques ont été centrifugées à 200 g, 10 minutes à 20°C. Les surnageants ont été retirés et 400  $\mu$ l de tampon de lyse ont été ajoutés aux puits. Après une incubation de 30 minutes à TP, les plaques ont à nouveau été centrifugées à 200 g, 10 minutes à 20°C. 20  $\mu$ l de surnageant ont ensuite été ajoutés dans des puits contenant de la streptavidine, puis 80  $\mu$ l d'immuno-réactif (1 :20 d'anticorps anti-histone-biotine + 1 :20 d'anticorps anti-ADN-peroxydase + 18 :20 tampon d'incubation) ont été ajoutés. Après une incubation de 2 heures à TP, les plaques ont été lavées 3 fois avec 300  $\mu$ l de tampon d'incubation. 100  $\mu$ l de solution ABTS ont été ajoutés et après 10 minutes d'incubation à TP, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 100  $\mu$ l de solution d'arrêt ABTS. La densité optique a été mesurée par spectrophotométrie (Bio-Rad) à 405 nm (longueur d'onde de référence à 490 nm).

Pour l'évaluation de l'apoptose par marquage à l'Annexin V (*PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I*, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada),  $2 \times 10^5$  cellules ont été mises dans des tubes pour cytométrie (BD Falcon) et ont été lavées avec du PBS froid. Les tubes ont été centrifugés à 200 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont été jetés

et les cellules ont été lavées à nouveau dans du tampon de liaison pour Annexin V. Après une seconde centrifugation, 5 µl d'Annexin V-PE et 5 µl de 7-amino-actinomycine D (7-AAD) par  $1 \times 10^5$  cellules ont été ajoutés aux tubes. Les cellules ont été incubées pendant 15 minutes à TP à l'abri de la lumière, puis elles ont été lavées dans du tampon de liaison pour Annexin V contenant 4 µg/ml d'actinomycine D (Sigma-Aldrich) et centrifugées à 200 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont été enlevés et les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) 1% (Fisher) + 4 µg/ml d'actinomycine D pendant 15 minutes à TP à l'abri de la lumière. Après un lavage dans du tampon de liaison pour Annexin V contenant 4 µg/ml d'actinomycine D, les cellules ont été resuspendues dans du tampon de liaison pour Annexin V. Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences) et les résultats analysés à l'aide du logiciel CellQuest Pro.

## **7. ISOLEMENT DES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE**

Les PBMCs ont été isolées de donneurs volontaires de l'INRS – Institut Armand-Frappier. Pour chaque donneur, entre 60 et 90 ml de sang ont été prélevés dans des tubes héparinés (BD Falcon), puis le sang a été dilué (1 :2) avec du PBS. Par la suite, 25 ml de la solution sanguine diluée ont été déposés délicatement sur 15 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). Après centrifugation à 400 g, 30 minutes à 20°C sans frein, le surnageant a délicatement été prélevé et jeté, puis les PBMCs (anneau à l'interphase) ont été récoltées et transférées dans des tubes de 50 ml (Corning). Elles ont été lavées avec du PBS (1 :1) et centrifugées à 300 g, 15 minutes à 20°C avec frein. Le culot cellulaire a ensuite été resuspendu dans du PBS pour un second lavage et les cellules ont été centrifugées à 250 g, 15 minutes à 20°C avec frein. Les cellules étaient ensuite resuspendues dans le tampon ou le milieu de culture approprié selon l'expérience effectuée et ont été comptées à l'hémacymètre.

## **8. ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE INCUBÉES AVEC LE VIRUS ET STIMULÉES VIA LES TLRs**

Afin de déterminer l'impact du VHC sur la production de cytokines par les PBMCs totales stimulées par différents ligands des TLRs, les PBMCs fraîchement isolées et resuspendues dans du milieu RPMI complet (10% SBF + strep/pen + 1 :100 L-glutamine) ont été ensemencées dans des plateaux 24 puits (Corning) à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules par puits dans un volume final de 900  $\mu$ l. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 3h avec 1 ml de surnageant infectieux JFH1 (ou du surnageant de culture de cellules Huh-7.5 non infectées correspondant au même jour p.i.) à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Par la suite, 100  $\mu$ l par puits des différents ligands des TLRs ont été ajoutés (en duplicata). Les ligands suivants ont été utilisés : l'acide lipotéichoïque (LTA) (Sigma-Aldrich) pour le TLR-2 à une concentration finale de 5  $\mu$ g/ml ; l'acide poly (inosinique : cytidylique (poly (I :C)) (Sigma-Aldrich) pour le TLR-3 à une concentration finale de 20  $\mu$ g/ml ; le lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) pour le TLR-4 à une concentration finale de 2  $\mu$ g/ml et finalement, l'imidazoquinoline resiquimod (R-848) (Invivogen, San Diego, CA, USA) pour les TLRs-7/8 à une concentration finale de 2  $\mu$ g/ml. Après une incubation de 48h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> les surnageants ont été centrifugés à 1500 rpm, pendant 5 min avant d'être congelés à -80°C jusqu'au dosage des cytokines (IL-10, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) par ELISA.

## **9. ISOLEMENT DES MONOCYTES PAR AUTOMACS**

Les PBMCs fraîchement isolées et resuspendues dans du tampon pour AutoMACS (0.5% (p/v) de BSA (Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) et 2mM EDTA (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) dans du PBS) ont été centrifugées à 300 g, 10 minutes à 4°C. Les monocytes ont été isolés avec le kit *Monocyte Isolation Kit II* (Miltenyi, Gergisch Gladbach, Allemagne) qui permet l'isolement des monocytes à partir des PBMCs par déplétion des cellules non monocytaires. Après centrifugation, le surnageant a été délicatement retiré et les cellules ont été resuspendues dans 30  $\mu$ l de tampon pour AutoMACS par  $10^7$  cellules. 10  $\mu$ l de *FcR Blocking Reagent* et 10  $\mu$ l du cocktail

d'anticorps conjugués à la biotine (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, and CD235a) par  $10^7$  cellules ont été ajoutés et les cellules ont été incubées à 4°C pendant 10 minutes. Par la suite, 30  $\mu$ l de tampon pour AutoMACS et 20  $\mu$ l de billes magnétiques anti-biotine par  $10^7$  cellules ont été ajoutés. Après une incubation de 15 minutes à 4°C, les cellules ont été lavées dans 2 ml de tampon pour AutoMACS et centrifugées à 300 g, 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été délicatement enlevé et les cellules ont été resuspendues dans 500  $\mu$ l de tampon pour AutoMACS par  $10^8$  cellules. Les monocytes ont ensuite été isolés par déplétion magnétique automatisée (AutoMACS, Miltenyi). La fraction négative contenant les monocytes a été récoltée et lavée avec du milieu RPMI complet et centrifugée à 300 g, 10 minutes à 4°C.

## **10. GÉNÉRATION DE CELLULES DENDRITIQUES À PARTIR DE MONOCYTES (MoCDs)**

Les monocytes fraîchement isolés ont été resuspendus dans du milieu complet RPMI contenant 5 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) et 40 ng/ml d'IL-4 (R&D Systems) recombinants humains (milieu complet pour MoCDs) afin de générer des cellules dendritiques. La concentration cellulaire a été déterminée et ajustée à  $5 \times 10^5$  cellules/ml. Quatre ml/puits ont été déposés dans une plaque 6 puits (Corning). Les cellules ont été cultivées pendant 6 jours et du milieu frais a été ajouté aux puits à tous les 2 jours.

## **11. MATURATION DES MoCDs INCUBÉES AVEC LE VIRUS ET ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION SUR LES MoCDs PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX**

Au bout de 6 jours de culture, les MoCDs immatures (non adhérentes) ont été récoltées des puits, lavées une fois avec du PBS et centrifugées à 300 g, 10 minutes à 20°C. Le culot a été resuspendu dans du milieu RPMI complet et la concentration cellulaire a été évaluée. Les cellules ont été resuspendues à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml et 250  $\mu$ l ( $2.5 \times 10^5$  cellules) ont été déposés dans une plaque 48 puits. 1 ml de surnageant

infectieux JFH1 (ou de surnageant de culture de cellules Huh-7.5 non infectées correspondant au même jour p.i.) ont été ajoutés aux puits (en duplicata). Après une incubation de 3h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, la maturation des MoCDs a été induite en ajoutant du LPS à 0.1 µg/ml final + CD40L recombinant humain (R&D Systems) à 400 ng/ml. La production de cytokines après 24h de maturation (IL-12p70, IL-10 et TNF-α) a été analysée en récoltant les surnageants de culture qui ont été centrifugés à 1500 rpm pendant 5 min. Les surnageants ont été conservés à -80°C jusqu'au dosage des cytokines.

Après 24h de culture, les MoCDs ont été lavées avec du tampon pour la cytométrie (1% BSA (p/v) + 0.1% d'azide de sodium (v/v) (USB Corporation) dans du PBS), puis centrifugées à 1500 rpm, pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants ont été jetés et les cellules resuspendues dans du tampon pour cytométrie. Afin d'évaluer la maturation des MoCDs, les cellules ont été marquées avec les anticorps suivants : anti-CD80-FITC, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD83-PE, anti-CD86-PE et anti-CD11c-APC (eBioscience, San Diego, CA, USA) ou leurs contrôles isotypiques respectifs. Après une incubation de 20 minutes à 4°C, les cellules ont été lavées 2 fois avec du tampon pour cytométrie avant d'être fixées avec de la PFA 1%. L'expression de marqueurs à la surface des MoCDs (cellules CD11c<sup>+</sup>) a été analysée par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences) et les résultats analysés à l'aide du logiciel CellQuest Pro.

## **12. ÉVALUATION DE LA CAPACITÉ ALLOSTIMULATRICE DES MoCDs PAR RÉACTION LYMPHOCYTAIRE MIXTE (MLR)**

Pour la MLR, après 24 heures de maturation, les MoCDs ont été irradiées à 3000 rad, lavées 2 fois avec du milieu RPMI complet, puis transférées dans des plaques 96 puits à fond plat à différents ratios MoCDs : PBMCs allogéniques. Les PBMCs allogéniques fraîchement isolées ont été resuspendues à 2x10<sup>6</sup> cellules/ml dans du milieu RPMI complet et 100 µl/puits ont été ajoutés aux MoCDs. Les volumes ont été complétés à 200 µl/puits et les plateaux ont été incubés pendant 5 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Afin de quantifier la prolifération des PBMCs allogéniques, 0.4 µCi/puits de <sup>3</sup>H<sub>T</sub>Thymidine (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) ont été ajoutés. Après une incubation de 16 heures,

l'ADN contenu dans les puits a été absorbé par Harvester (Tomtec, Hamden, CT, USA) sur des membranes (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) et du liquide à scintillation (PerkinElmer) a été ajouté aux membranes. La radioactivité a ensuite été mesurée par compteur à scintillation (TRILUX 1450 Microbeta, PerkinElmer).

### **13. QUANTIFICATION DES CYTOKINES PAR ELISA**

Afin de quantifier la production de cytokines par les différentes populations de cellules immunitaires, les surnageants de culture (PBMCs ou MoCDs) ont été récoltés et centrifugés à 1500 rpm, 5 minutes pour éliminer les cellules. Les surnageants ont ensuite été transférés dans des eppendorfs propres et conservés à -80°C jusqu'au dosage des cytokines par ELISA.

Les kits ELISA anti-IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  humains (eBiosciences) ont été utilisés selon le protocole recommandé par le fournisseur. En bref, les anticorps de capture dilués 1 :250 dans le tampon de capture ont été absorbés durant 16 heures à 4°C. Les puits ont ensuite été lavés 5 fois au PBS-0.05% Tween20 (USB Corporation) et bloqués pendant 1 heure à TP avec du diluant 1X. Après 5 autres lavages, 100  $\mu$ l des surnageants de culture dilués de façon appropriée dans le diluant 1X ont été ajoutés aux puits, de même que 100  $\mu$ l des dilutions en série (1 :2) des standards. Après une incubation de 2 heures à TP, les puits ont été lavés 5 fois et 100  $\mu$ l des anticorps de détection dilués 1 :250 dans le diluant 1X ont été ajoutés aux puits. L'incubation a duré 1 heure et les puits ont ensuite été lavés 5 fois. Par la suite, 100  $\mu$ l/puits d'avidine-HRP ont été ajoutés et les plaques ont été incubées à TP pendant 30 minutes. Après 7 lavages, 100  $\mu$ l de substrat TMB ont été ajoutés aux puits pendant 30 minutes et 50  $\mu$ l de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ont été ajoutés pour arrêter la réaction. La densité optique a été mesurée par spectrophotométrie (Bio-Rad) à 570 nm (longueur d'onde de référence 490 nm). La courbe standard a été faite et les concentrations de cytokines contenues dans les surnageants de culture ont pu être calculées.

#### **14. CO-CULTURES DE CELLULES HUH-7.5 ET MoDCs**

Des cellules Huh-7.5 infectées, non infectées (à différents temps p.i.) ou non infectées mais apoptotiques (induction de l'apoptose par rayons ultra-violet (UVs) pendant 5 minutes) ont été mises en co-cultures avec des MoDCs immatures, à un ratio de 1 :1 dans des plateaux 6 puits dans du milieu RPMI complet. 48h plus tard, l'expression des marqueurs de maturation a été analysée par cytométrie en flux, tel que décrit au point 11.

#### **15. ANALYSES STATISTIQUES**

À l'aide du logiciel GraphPad Prism (San Diego, CA, USA), le test statistique One-Way ANOVA a été utilisé sur les données obtenues afin d'évaluer si les différences observées étaient statistiquement significatives. Une valeur  $p < 0.05$  était considérée comme statistiquement significative.

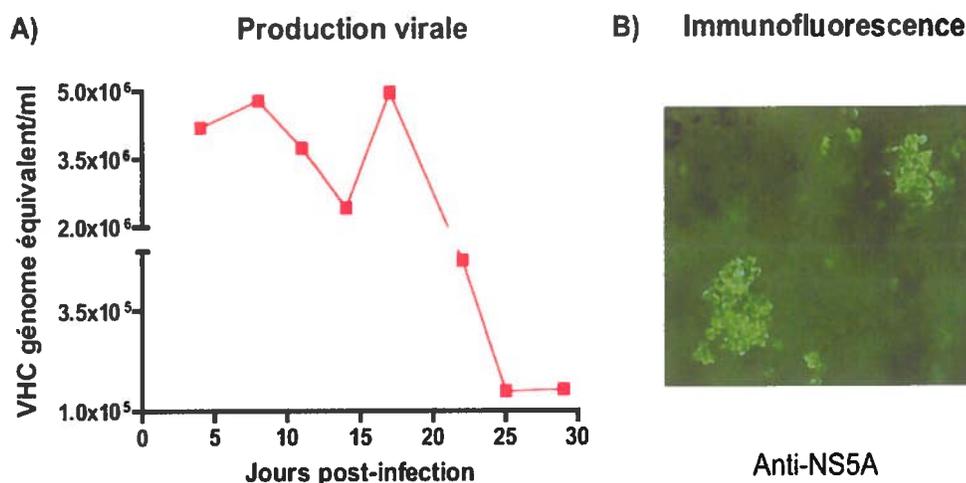
## **CHAPITRE 3**

## **RÉSULTATS**

## 1. INFECTION DES CELLULES HUH-7.5 PAR JFH1

### 1.1 QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL ET DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX

La production du VHC en culture cellulaire par le système du clone infectieux JFH1 a été réalisée afin d'utiliser le surnageant infectieux sur les cellules du système immunitaire et ainsi pouvoir analyser l'effet du virus sur ces cellules. Telle que décrite au point 2 de la section 2, la production du VHC en culture cellulaire a été effectuée en infectant des cellules Huh-7.5 naïves avec du surnageant infectieux (provenant de la transfection de cellules Huh-7.5 avec le plasmide pJFH1). Afin de quantifier la production virale dans le surnageant, l'ARN total a été extrait des surnageants à chaque passage des cellules et quantifié par RT-PCR quantitatif. Par ailleurs, le titre infectieux a été déterminé par immunofluorescence en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine non-structurale NS5A et un second anticorps Alexa Fluor 488.



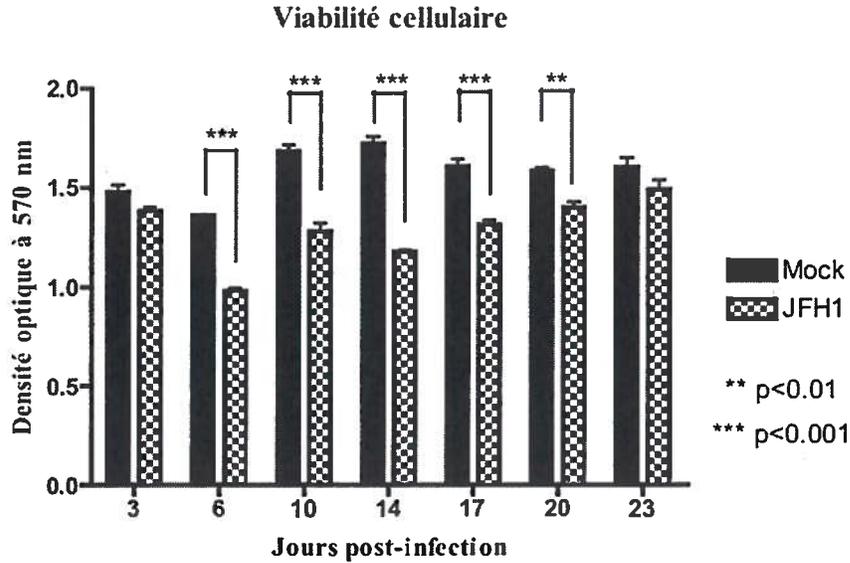
**Figure 5 : A) Quantification de l'ARN viral total à différents jours post-infection dans le surnageant de culture de cellules Huh-7.5 infectées par JFH1. B) Immunofluorescence démontrant la présence de foyers de cellules infectées lors de la détermination du titre infectieux des surnageants.**

A) Des cellules Huh-7.5 naïves ont été infectées avec du surnageant infectieux à une MOI de 0.01. L'ARN total présent dans le surnageant de culture a été extrait par Trizol LS, rétrotranscrit en ADNc et quantifié par RT-PCR quantitatif. B) Des cellules Huh-7.5 naïves ont été infectées avec des dilutions en série des surnageants infectieux. Le titre infectieux a été déterminé par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps de lapin dirigé contre la protéine NS5A et d'un second anticorps anti-lapin Alexa Fluor 488.

La figure 5A présente un exemple de production virale, mais il est à noter qu'elle était variable d'une infection à une autre. Nous pouvons observer que la quantité d'ARN viral total produite est importante. Dans ce cas-ci, nous observons une diminution de la production vers le jour 21 p.i. mais les cellules demeurent infectées de façon persistante et la quantité d'ARN peut remonter par la suite (résultats non présentés). La figure 5B démontre la formation de foyers infectieux chez les cellules Huh-7.5 naïves infectées avec du surnageant de production virale. En règle générale, le titre infectieux était plus faible que la quantité d'ARN viral total déterminée par RT-PCR quantitatif, à raison d'une particule virale infectieuse pour 1000 copies d'ARN viral (résultats non présentés).

## **1.2 VIABILITÉ CELLULAIRE DES CELLULES HUH-7.5 INFECTÉES PAR JFH1**

Afin d'évaluer l'effet du JFH1 sur les cellules Huh-7.5, la viabilité cellulaire de ces cellules a été analysée à différents jours p.i. par le test colorimétrique MTT. Le test a été effectué sur des cellules infectées et la viabilité a été comparée à celle de cellules Huh-7.5 non infectées (Mock).



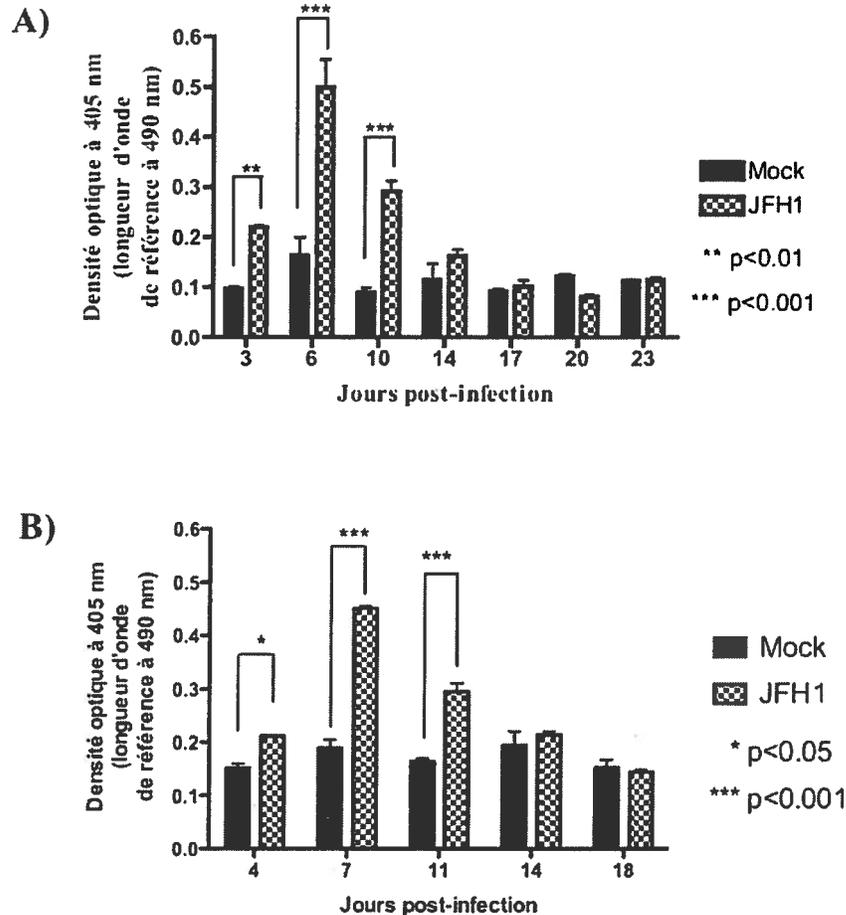
**Figure 6 : Viabilité des cellules Huh-7.5 infectées par JFH1 à différents temps post-infection.**

Les cellules Huh-7.5 infectées ou non ont été mises en culture (en quadruplicate) pour la nuit à raison de  $2.5 \times 10^4$  cellules par puits. Le lendemain, 10  $\mu$ l de sel de tétrazolium MTT ont été ajoutés pendant 4 heures. Le MTT est réduit en formazan par les cellules viables et métaboliquement actives via l'action des déshydrogénases mitochondriales. Par la suite, 100  $\mu$ l de tampon de solubilisation ont été ajoutés et après une incubation de 16h, la formation de formazan a été mesurée par spectrophotométrie. ( $n = 3$ )

Nous pouvons constater à la figure 6 que l'infection des cellules Huh-7.5 par JFH1 se traduit par une baisse significative de la viabilité cellulaire comparativement aux cellules non-infectées (Mock) dès le jour 6 p.i. De plus, la diminution de la viabilité persiste jusqu'au jour 20.

### 1.3 QUANTIFICATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR JFH1

Afin de déterminer la cause de la baisse de viabilité cellulaire observée dans les cellules infectées, nous avons analysé les niveaux d'apoptose dans ces cellules. Pour ce faire, nous avons effectué deux tests différents en parallèle. Tout d'abord, l'apoptose a été évaluée par ELISA (figure 7), qui permettait de mesurer la fragmentation de l'ADN entre les nucléosomes, caractéristique de l'apoptose. Les cellules infectées ou non ont été cultivées et lysées et le lysat a ensuite été incubé avec des anticorps anti-histone et anti-ADN couplés à la peroxydase, permettant la détection de l'ADN fragmenté (nucléosomes).

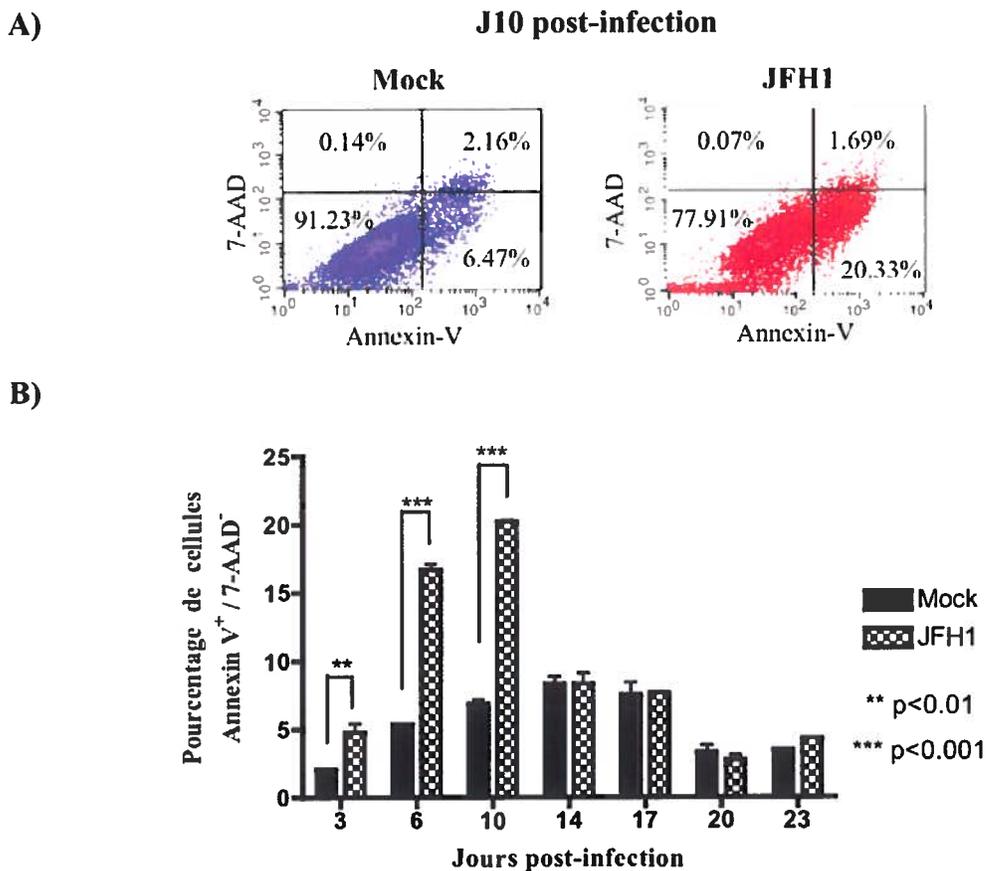


**Figure 7 : Évaluation de l'apoptose induite par l'infection dans les cellules Huh-7.5 par ELISA.**

Les cellules Huh-7.5 infectées ou non ont été cultivées pendant 16 heures à une concentration de  $2.5 \times 10^4$  cellules (en duplicata) dans des plateaux 48 puits. Les cellules ont ensuite été lysées et la présence de nucléosomes dans le lysat a été mesurée par ELISA en utilisant des anticorps dirigés contre les histones et l'ADN. A) ( $n = 3$ ) B) ( $n = 1$ )

L'apoptose a également été mesurée par un double marquage à l'Annexin V-PE et au 7-AAD et les résultats ont été analysés par cytométrie en flux (figure 8). L'Annexin V a une forte affinité pour la phosphatidylsérine (PS) qui, lors de l'apoptose, est transloquée du feuillet interne de la membrane plasmique au feuillet externe (perte de l'asymétrie membranaire). Ainsi, chez les cellules apoptotiques, la PS est rapidement externalisée, ce qui permet la liaison de l'Annexin V. Comme la PS peut également être externalisée lors de la nécrose, l'utilisation d'un second marqueur, le 7-AAD est nécessaire pour distinguer les cellules mortes par apoptose de celles mortes par nécrose. Le 7-AAD se lie à l'ADN,

mais ne peut pénétrer que dans les cellules qui ont perdu leur intégrité membranaire, ce qui se produit dans la nécrose ou lors des stades tardifs de l'apoptose. Les cellules négatives pour les deux marqueurs sont donc viables, tandis que les cellules Annexin V<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup> sont en apoptose. Quant aux cellules Annexin V<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>, elles sont en nécrose et finalement, les cellules positives pour les deux marqueurs sont soit en nécrose, soit à un stade tardif de l'apoptose.



**Figure 8 : Évaluation de l'apoptose induite par l'infection dans les cellules Huh-7.5 par cytométrie en flux.**

À différents temps post-infection, les cellules Huh-7.5 infectées ou non ont été marquées (en duplicata) à l'Annexin V-PE et au 7-AAD, fixées puis analysées par cytométrie en flux. A) Résultats de cytométrie en flux de cellules Huh-7.5 au jour 10 post-infection. B) Pourcentage de cellules apoptotiques (Annexin V<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>) à différents temps post-infection. ( $n = 3$ )

Les figures 7 et 8 démontrent que la baisse significative de la viabilité dans les cellules Huh-7.5 infectées par JFH1 observée à la figure 6 est due à l'induction de l'apoptose dans ces cellules. Tout d'abord, à la figure 7 nous pouvons observer que l'infection cause une augmentation significative de l'apoptose, qui était mesurée dans ce cas-ci par ELISA, permettant la détection de la fragmentation de l'ADN. L'apoptose induite apparaît dès le jour 3 p.i. chez les cellules infectées et elle demeure significativement plus élevée que dans les cellules non infectées jusqu'au jour 11 p.i environ.

Les résultats ont été confirmés par cytométrie en flux (figure 8). En effet, le pourcentage de cellules Annexin V<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup> (cellules apoptotiques) est significativement plus élevé dans les cellules infectées par JFH1 que dans les cellules non infectées. Encore une fois, l'apoptose apparaît rapidement dans les cellules infectées, dès le jour 3 p.i. et demeure plus importante que dans les cellules non-infectées jusqu'au jour 10 p.i. Les résultats de cytométrie en flux nous permettent également d'affirmer que la baisse de la viabilité chez les cellules infectées semble être uniquement due à l'apoptose et non à la nécrose, puisque le pourcentage de cellules 7-AAD<sup>+</sup> n'est pas supérieur chez les cellules infectées (figure 8A et résultats non présentés).

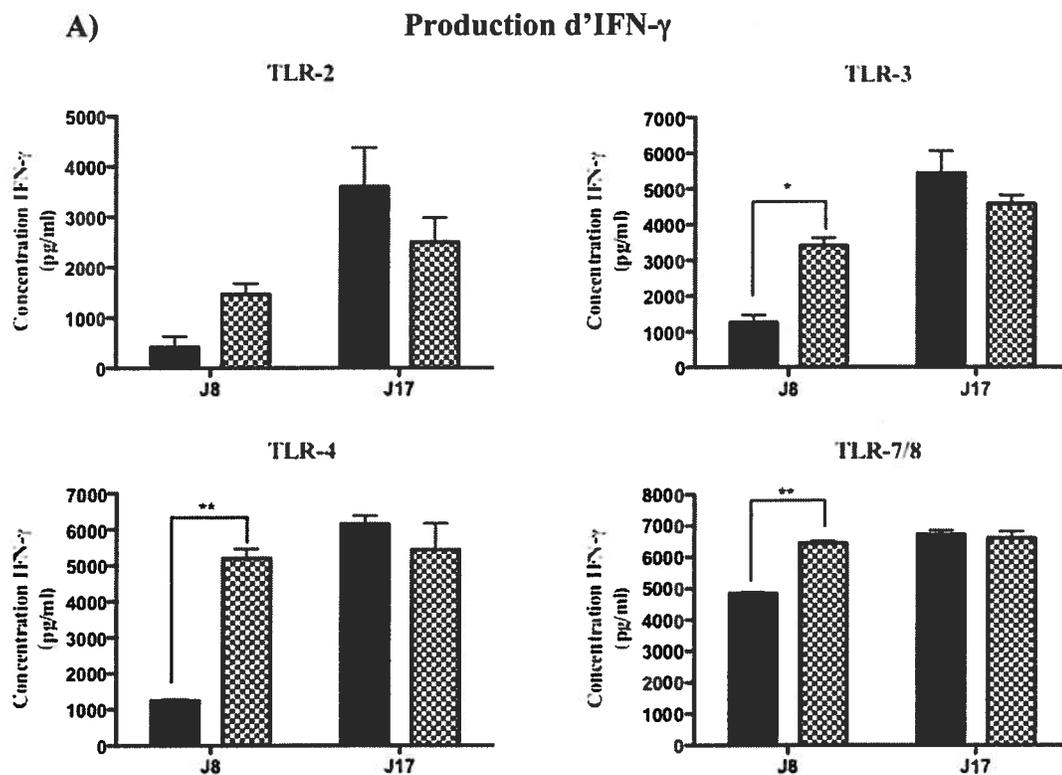
## **2. PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE INCUBÉES AVEC JFH1 ET STIMULÉES PAR LES LIGANDS DES TLRs**

Une fois l'infection de cellules Huh-7.5 par JFH1 mieux caractérisée, nous avons utilisé les surnageants de culture, infectieux ou non, afin de déterminer l'effet du virus sur les fonctions des cellules du système immunitaire.

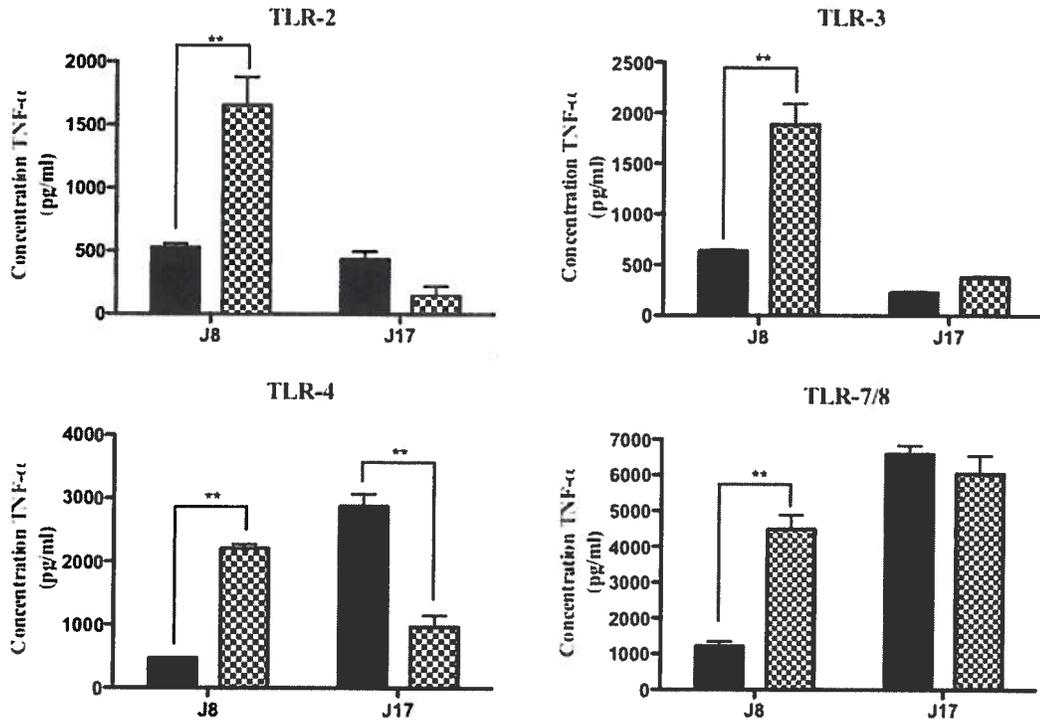
Puisqu'il a été démontré que le VHC pouvait interférer avec la signalisation des TLRs (voir section 1 point 5.2.1), nous avons tout d'abord voulu vérifier si la présence du virus pouvait altérer la production de cytokines par les PBMCs totales fraîchement isolées et stimulées par différents ligands des TLRs. À l'exception du TLR-9, tous les TLRs impliqués dans la reconnaissance de virus ont été analysés (TLRs-2, 3, 4 et 7/8). La

production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) et anti-inflammatoire (IL-10) par les PBMCs incubées avec le virus avant d'être stimulées par les ligands des TLRs a été quantifiée par ELISA.

Par contre, comme nous avons préalablement démontré que l'infection induisait l'apoptose dans les cellules Huh-7.5 dans les premiers jours de l'infection (jusqu'au jour 11 p.i. environ), nous avons voulu vérifier si l'apoptose et/ou le virus pouvaient avoir un effet sur la production de cytokines par les PBMCs totales. Nous avons donc utilisé des surnageants qui avaient des titres viraux similaires, mais provenant de cellules qui étaient encore en apoptose (jour 8 p.i.) ou de cellules qui n'étaient plus en apoptose (jour 17 p.i.).



B) Production de TNF- $\alpha$





semble pas inhiber ou augmenter la production de cytokines induite par la stimulation des TLRs chez les PBMCs. La seule différence significative observée est celle de la diminution de la production de TNF- $\alpha$  (figure 9B) lorsque les PBMCs ont été incubées avec du surnageant infectieux du jour 17 p.i. et stimulées par le ligand du TLR-4. Dans ce cas-ci, par contre, cette diminution n'a pas été observée chez les autres donneurs.

Par ailleurs, en présence de surnageant infectieux provenant de cellules apoptotiques (surnageant JFH1 du J8 p.i), on peut observer une augmentation significative de la production des différentes cytokines testées, et ce, pour la plupart des ligands des TLRs comparativement au surnageant non infectieux et non apoptotique (Mock).

### **3. EFFET DE JFH1 SUR LES CELLULES DENDRITIQUES GÉNÉRÉES À PARTIR DE MONOCYTES**

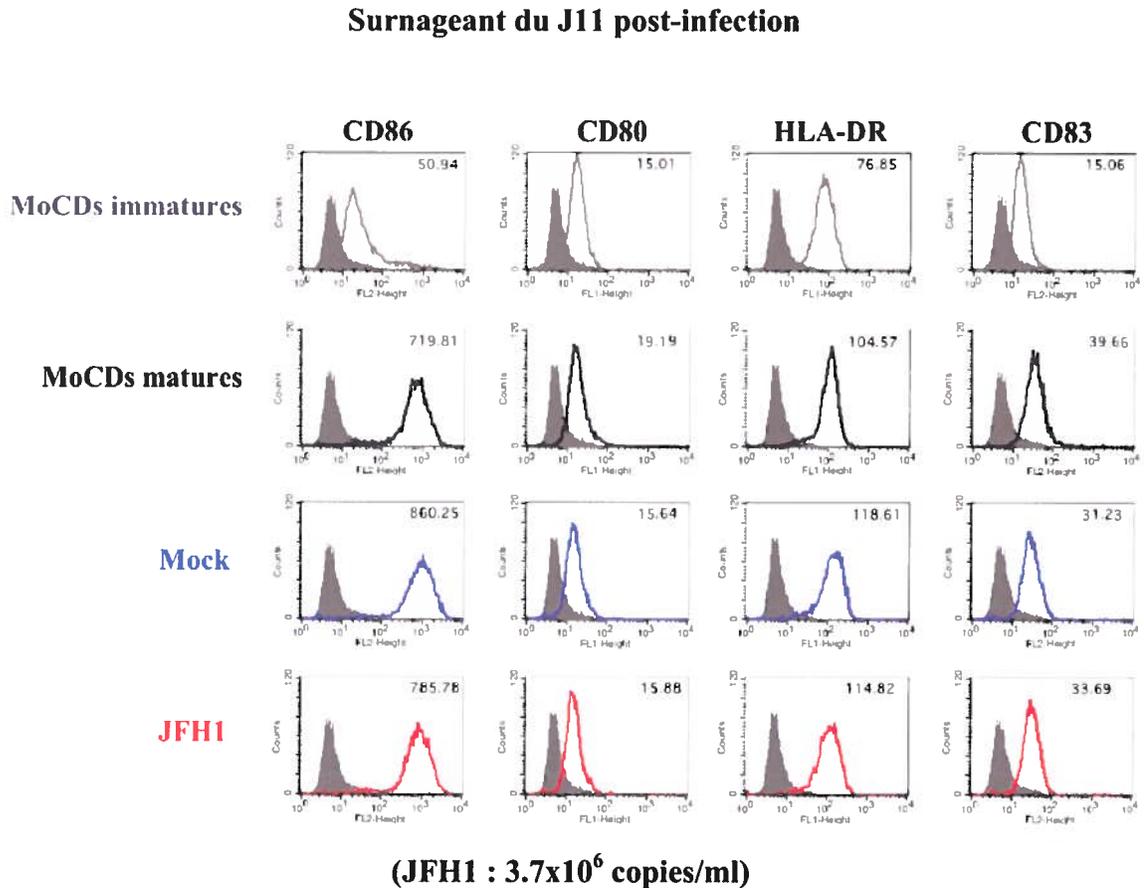
Puisque la littérature démontre des résultats contradictoires sur l'état des CD8 isolées de patients infectés de façon chronique, nous désirions déterminer si le virus avait un effet sur la maturation et les fonctions de ces cellules, mais cette fois-ci dans un contexte qui mime l'infection aiguë, puisque c'est à ce moment de l'infection que l'établissement de la réponse immunitaire cellulaire est nécessaire pour éliminer le virus.

Nous avons donc généré des CD8 à partir de monocytes isolés de donneurs sains et avons incubé les MoCD8 avec du surnageant infectieux ou non. Une fois de plus, nous avons utilisé du surnageant de différents temps p.i. afin de vérifier si l'apoptose induite par l'infection du VHC dans les cellules Huh-7.5 pouvait également avoir un effet sur les MoCD8.

#### **3.1 EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION**

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si la maturation des MoCD8 était inhibée en présence du virus. Les MoCD8 ont donc été incubées avec du surnageant provenant de cellules Huh-7.5 non infectées ou infectées (provenant de cellules apoptotiques ou non), puis un cocktail de maturation, composé de LPS et de CD40L a été

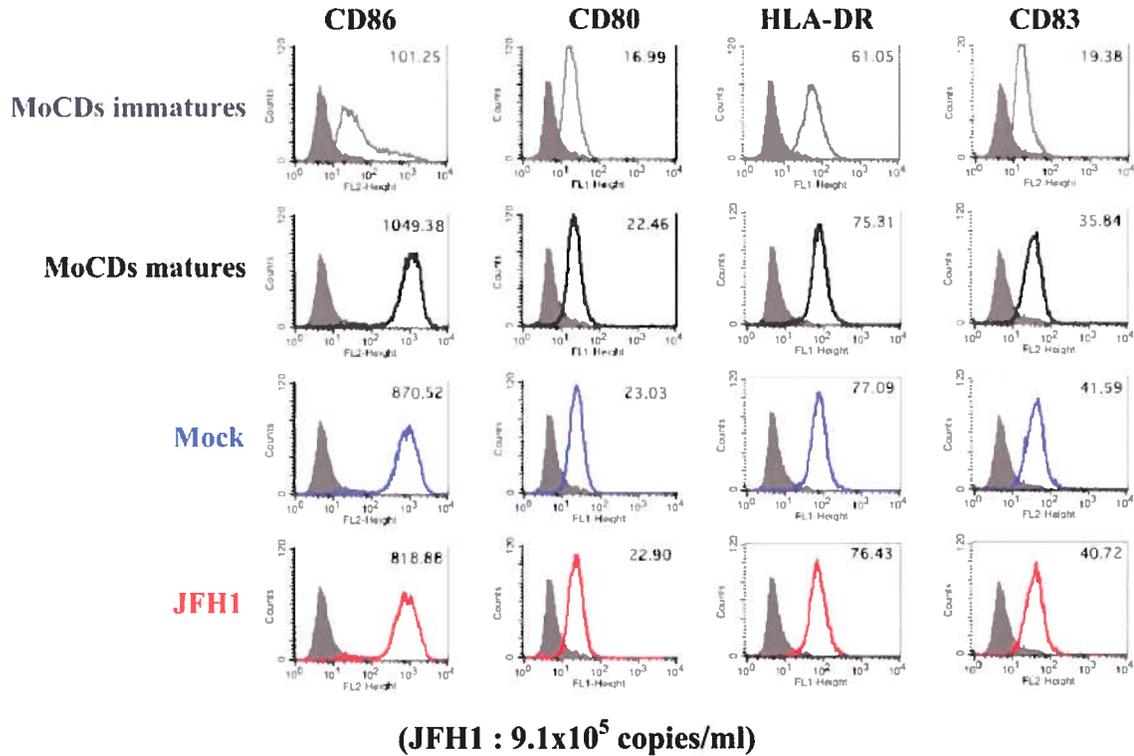
ajouté. Le lendemain, les MoCDs ont été récoltées et l'expression des marqueurs de maturation (CD80, CD86, HLA-DR et CD83) a été analysée par cytométrie en flux. L'expression des différents marqueurs a été comparée à celle observée sur des MoCDs immatures afin d'évaluer la maturation des MoCDs.



**Figure 10 : Expression des marqueurs de maturation sur les MoCDs incubées ou non avec du surnageant du jour 11 post-infection de cellules Huh-7.5 non-infectées (Mock) ou infectées (JFH1).**

Les MoCDs ont été générées à partir de monocytes isolés de donneurs sains, puis incubées en présence de surnageant infectieux ou non infectieux du jour 11 p.i. pendant 3 heures (en duplicata). La maturation a ensuite été induite par l'ajout de LPS à 0.1 µg/ml et de CD40L à 400 ng/ml. 24 heures plus tard, les cellules ont été marquées avec les anticorps anti-CD11c-APC, anti-CD86-PE, anti-CD80-FITC, anti-HLA-DR-FITC et anti-CD83-PE ou leurs contrôles isotypiques respectifs (courbes pleines en gris). L'expression des marqueurs de maturation, sur la population CD11c<sup>+</sup> (cellules dendritiques) a été analysée par cytométrie en flux. Des MoCDs qui n'ont pas eu de cocktail de maturation (MoCDs immatures) ont été utilisées à titre de contrôle négatif. Des MoCDs ayant reçu le cocktail de maturation mais n'ayant pas été incubées préalablement avec du surnageant de culture de cellules Huh-7.5 (MoCDs matures) ont été utilisées comme contrôle positif. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) est indiquée pour chaque marqueur (1 donneur représentatif de 4 donneurs).

## Surnageant du J25 post-infection



**Figure 11 : Expression des marqueurs de maturation sur les MoCDs incubées avec du surnageant du jour 25 post-infection de cellules Huh-7.5 non-infectées (Mock) ou infectées (JFH1).**

Les MoCDs ont été générées à partir de monocytes isolés de donneurs sains, puis incubées en présence de surnageant infectieux ou non infectieux du jour 25 p.i. pendant 3 heures (en duplicata). La maturation a ensuite été induite par l'ajout de LPS à 0.1 µg/ml et de CD40L à 400 ng/ml. 24 heures plus tard, les cellules ont été marquées avec les anticorps anti-CD11c-APC, anti-CD86-PE, anti-CD80-FITC, anti-HLA-DR-FITC et anti-CD83-PE ou leurs contrôles isotypiques respectifs (courbes pleines en gris). L'expression des marqueurs de maturation, sur la population CD11c<sup>+</sup> (cellules dendritiques), a été analysée par cytométrie en flux. Des MoCDs qui n'ont pas eu de cocktail de maturation (MoCDs immatures) ont été utilisées à titre de contrôle négatif. Des MoCDs ayant reçu le cocktail de maturation mais n'ayant pas été incubées préalablement avec du surnageant de culture de cellules Huh-7.5 (MoCDs matures), ont été utilisées comme contrôle positif. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) est indiquée pour chaque marqueur (*1 donneur représentatif de 3 donneurs*).

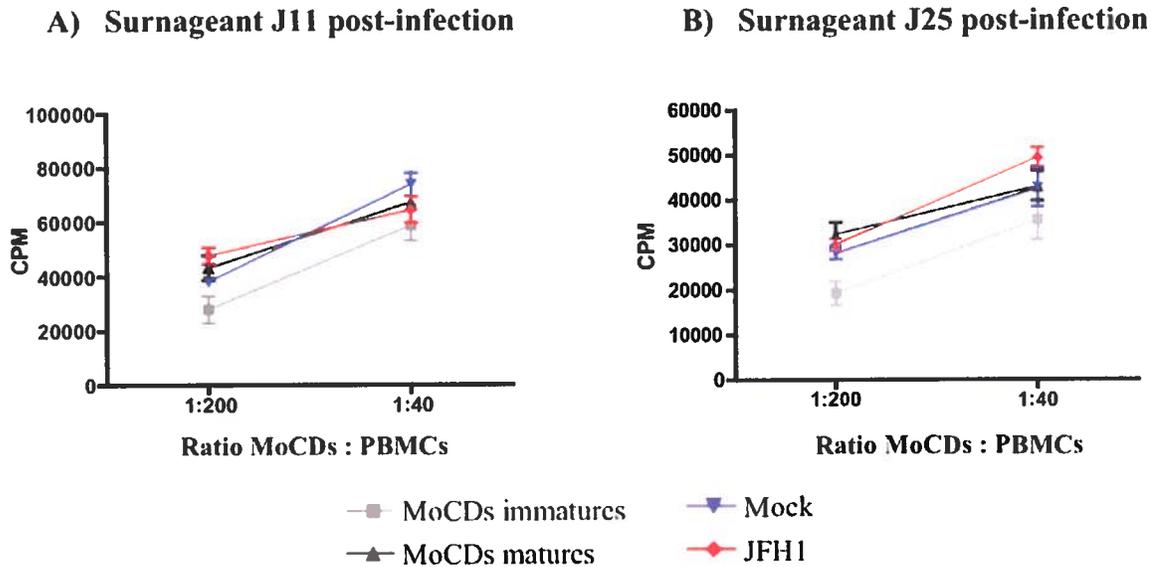
En premier lieu, nous pouvons voir que le cocktail de maturation utilisé induisait bel et bien la maturation des MoCDs puisqu'il y a une augmentation de l'expression des marqueurs de maturation sur les MoCDs matures comparativement aux MoCDs immatures (figures 10 et 11). Par ailleurs, la présence du virus ne semble pas inhiber la maturation des MoCDs puisque les MFI d'expression des marqueurs de maturation sont

similaires entre les MoCDs matures, les MoCDs incubées avec du surnageant non infectieux et les MoCDs incubées en présence de JFH1 (figures 10 et 11). De plus, la présence de surnageant provenant de cellules infectées apoptotiques (JFH1 du J11 p.i voir la figure 7B) ne modifie pas non plus l'expression des marqueurs de maturation (figure 10).

### **3.2 ÉVALUATION DE LA FONCTION ALLOSTIMULATRICE DES MoCDs PAR RÉACTION LYMPHOCYTAIRE MIXTE (MLR)**

Nous avons également analysé la fonction allostimulatrice (capacité de stimuler des PBMCs allogéniques) des MoCDs mises en présence du virus puisque des études ont démontré que cette fonction pouvait être altérée chez des patients infectés de façon chronique. Nous avons donc voulu vérifier si c'était également le cas dans notre système mimant l'infection aiguë.

Des MoCDs ont donc été incubées avec le virus ou du surnageant non infectieux et un cocktail de maturation a été ajouté. Les MoCDs ont ensuite été mises en culture à différents ratios avec des PBMCs allogéniques fraîchement isolées pendant 5 jours et la prolifération des PBMCs a été mesurée.



**Figure 12 : Réaction lymphocytaire mixte (MLR) de MoCDs préalablement incubées avec JFH1 ou du surnageant non infectieux.**

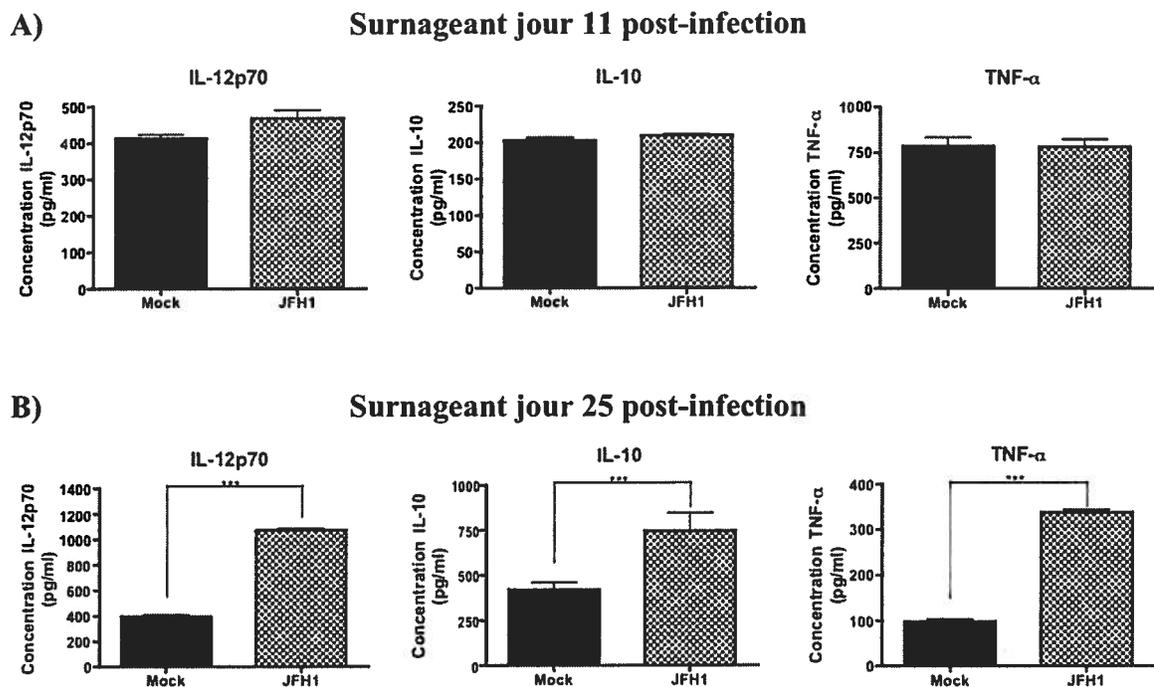
Les MoCDs ont été générées à partir de monocytes provenant de donneurs sains, puis elles ont été incubées pendant 3 heures avec du virus (JFH1) ou du surnageant non infectieux (Mock). L'ajout de LPS à 0.1 µg/ml et de CD40L à 400 ng/ml a induit la maturation de MoCDs. 24 heures plus tard, les MoCDs ont été irradiées et mises en culture avec des PBMCs allogéniques (en quadruplicate) à différents ratios. La MLR s'est poursuivie pendant 5 jours avant l'ajout de 0.4 µCi/puits de <sup>3</sup>HThymidine pendant les 18 dernières heures et l'incorporation de <sup>3</sup>HThymidine par les PBMCs allogéniques a été mesurée. La capacité allostimulatrice a été comparée à celle de MoCDs immatures et matures n'ayant pas été incubées avec du surnageant de culture de cellules Huh-7.5. A) MoCDs incubées avec du surnageant du J11 p.i. à 3.7x10<sup>6</sup> copies/ml. (n = 3) B) MoCDs incubées avec du surnageant du J25 p.i. à 9.1x10<sup>5</sup> copies/ml. (n = 3)

La figure 12 démontre que la présence du virus ne semble pas diminuer la capacité des MoCDs à stimuler les PBMCs allogéniques puisque celle-ci est comparable à celle de MoCDs matures (incubées avec du milieu RPMI complet) et à celle des MoCDs incubées avec du surnageant de cellules Huh-7.5 non infectées (Mock). De plus, la prolifération des PBMCs mises en culture avec des MoCDs incubées avec le virus est supérieure à celle des PBMCs dont la prolifération a été induite par des MoCDs immatures, ce qui confirme que le virus ne semble pas altérer la capacité allostimulatrice des MoCDs matures. Par ailleurs, cette capacité allostimulatrice n'est ni inhibée, ni augmentée par l'apoptose induite par l'infection dans les cellules Huh-7.5 (figure 12A, surnageant JFH1 du J11 p.i.).

### **3.3 PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES MoCDs**

Puisque dans nos expériences, nous n'avons observé aucune différence dans la maturation et la capacité allostimulatrice des MoCDs incubées en présence du VHC, nous avons également quantifié la production de cytokines par ces cellules puisque tel que mentionné précédemment, elle est importante dans la polarisation de la réponse T. De plus, certaines équipes ont démontré une diminution de la production de cytokines par les CD8 isolées de patients infectés chroniquement.

Des MoCDs ont encore une fois été mises en présence de surnageant non infectieux (Mock) ou infectieux (JFH1) et la maturation des MoCDs a ensuite été induite. Le lendemain, les surnageants de culture ont été récoltés pour le dosage de cytokines. Nous avons quantifié l'IL-12p70 et le TNF- $\alpha$  puisque leur production semble être diminuée chez certains patients (voir point 5.2.2 de la section 1), de même que l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire impliquée dans certaines infections virales persistantes (Ejraes et al. 2006).



**Figure 13 : Production d'IL-12p70, d'IL-10 et de TNF-α par les MoCDs matures incubées avec JFH1 ou du surnageant non infectieux.**

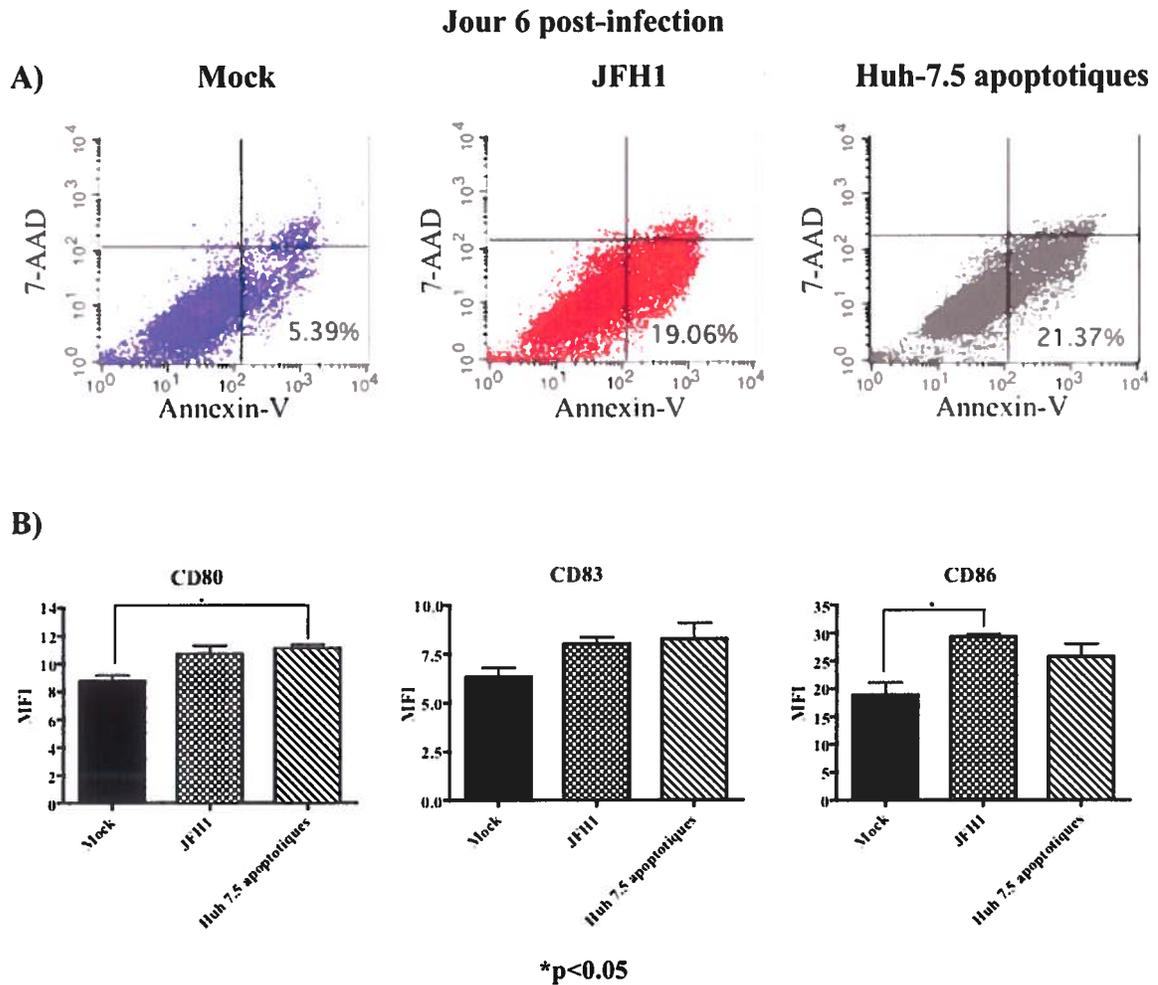
Les MoCDs incubées pendant 3 heures avec du surnageant infectieux (JFH1) ou non infectieux (Mock) ont ensuite été maturées par l'ajout de LPS à 0.1 µg/ml et de CD40L à 400 ng/ml. 24 heures plus tard, les surnageants de culture ont été récoltés, centrifugés et la quantité de cytokines a été déterminée par ELISA. A) Surnageant du J11 p.i. à  $3.7 \times 10^6$  copies/ml. ( $n = 4$ ) B) Surnageant du J25 p.i. à  $9.1 \times 10^5$  copies/ml ( $n = 5$ ).

Les résultats obtenus dans la production de cytokines par les MoCDs incubées ou non avec le virus contrastent avec ceux obtenus lors de l'expérience de production de cytokines par les PBMCs totaux (figure 9). Cette fois-ci, la présence du virus semble augmenter la production de cytokines par les MoCDs (J25 p.i. figure 13B) et cet effet est perdu lorsque le surnageant infectieux provient de cellules Huh-7.5 qui étaient en apoptose (J11 p.i. figure 13A).

#### 4. CO-CULTURES DE CELLULES HUH-7.5 ET MOCDs – EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION

Dans le but de vérifier si la présence des différents types de cellules Huh-7.5 (infectées ou non et apoptotiques ou non) pouvait induire l'expression de marqueurs de maturation

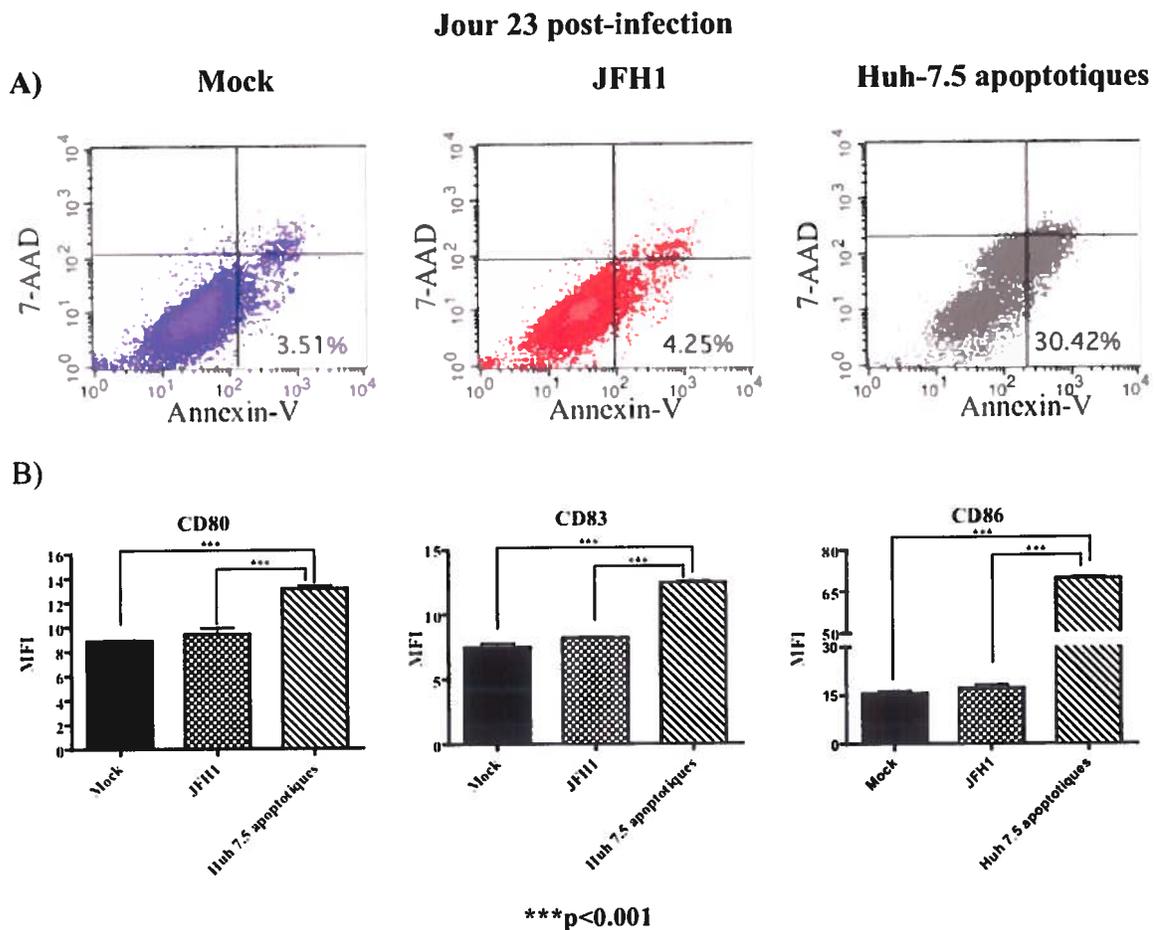
chez les MoCDs, nous avons mis en co-cultures des MoCDs et des cellules Huh-7.5 infectées (apoptotiques ou non), non infectées et non apoptotiques (Mock) ou non infectées, mais apoptotiques. Cette co-culture *in vitro* est un système qui peut représenter ce qui se passe au niveau du foie, là où les cellules hépatiques infectées sont en contact étroit avec différentes cellules du système immunitaire, telles que les CD.



**Figure 14 : A) Détermination par cytométrie en flux du pourcentage de cellules Huh-7.5 apoptotiques qui ont été mises en co-cultures avec les MoCDs. B) Expression des marqueurs de maturation sur les MoCDs mises en co-cultures avec les cellules Huh-7.5 du jour 6 post-infection.**

A) Au jour 6 post-infection, les cellules Huh-7.5 non infectées (Mock), infectées (JFH1) ou non infectées, mais apoptotiques (induction de l'apoptose par les UVs pendant 5 minutes) ont été marquées à l'Annexin V-PE et au 7-AAD et le pourcentage de cellules apoptotiques (Annexin V<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) a été déterminé par cytométrie en flux. B) Des MoCDs ont été mises en co-cultures à un ratio 1 : 1 (en duplicata) avec les cellules Huh-7.5 du jour 6 post-infection dont le taux d'apoptose a été déterminé en a) et 48 heures plus tard, l'expression de CD80, CD83 et CD86 sur les MoCDs (cellules CD11c<sup>+</sup>) a été analysée par cytométrie en flux. (n = 2)

La figure 14 démontre que la présence de cellules Huh-7.5 apoptotiques dans les co-cultures induit une certaine augmentation de l'expression des marqueurs de maturation sur les MoCDs (cellules infectées par JFH1 et Huh-7.5 non-infectées apoptotiques) comparativement aux co-cultures réalisées en présence de cellules Huh-7.5 non infectées et non apoptotiques (Mock). Afin de confirmer que l'effet observé est uniquement dû à la présence de cellules apoptotiques plutôt qu'à la présence du virus, nous avons répété la même expérience cette fois-ci avec des cellules du jour 23 p.i.



**Figure 15 : A) Détermination par cytométrie en flux du pourcentage de cellules Huh-7.5 apoptotiques qui ont été mises en co-cultures avec les MoCDs. B) Expression des marqueurs de maturation sur les MoCDs mises en co-cultures avec les cellules Huh-7.5 du jour 23 post-infection.**

A) Au jour 23 post-infection les cellules Huh-7.5 non infectées (Mock), infectées (JFH1) ou non infectées, mais apoptotiques (induction de l'apoptose par les UVs pendant 5 minutes) ont été marquées à l'Annexin V-PE et au 7-AAD et le pourcentage de cellules apoptotiques ( $\text{Annexin V}^+ / 7\text{-AAD}^-$ ) a été déterminé par cytométrie en flux. B) Des MoCDs ont été mises en co-cultures (ratio 1 : 1) avec les cellules Huh-7.5 du jour 23 post-infection dont le taux d'apoptose a été déterminé en a) et 48 heures plus tard, l'expression de CD80, CD83 et CD86 sur les MoCDs (cellules  $\text{CD11c}^+$ ) a été analysée par cytométrie en flux. ( $n = 2$ )

La figure 15 confirme que l'augmentation de l'expression des marqueurs de maturation observée à la surface des MoCDs (figure 14) est bien due à la présence de cellules apoptotiques. En effet, au jour 23 p.i. les cellules Huh-7.5 infectées ne sont plus en apoptose (taux similaire à celui des cellules non-infectées : figure 15A). Ainsi, seules les MoCDs qui ont été en co-cultures avec les cellules Huh-7.5 non-infectées, mais apoptotiques présentent une augmentation significative de l'expression des marqueurs comparativement aux co-cultures avec des cellules Huh-7.5 non infectées ou infectées.

## **CHAPITRE 4**

## **DISCUSSION**

Pendant de nombreuses années, aucun système de production de virus infectieux en culture cellulaire n'existait pour le VHC. Le développement, en 2005, du clone infectieux JFH1 a permis, entre autres, de mieux caractériser le cycle de réplication du VHC. Chez les patients infectés de façon chronique, certaines études ont démontré que le virus pouvait avoir un effet sur les cellules du système immunitaire. Le but de notre recherche était d'évaluer l'effet du VHC sur les cellules du système immunitaire dans un contexte mimant l'infection aiguë puisque c'est à ce moment que la réponse immunitaire cellulaire nécessaire à l'élimination du virus se développe. Il est donc possible que le virus interfère avec les cellules du système immunitaire afin d'empêcher l'élaboration de la réponse cellulaire. Nous avons utilisé le système JFH1 afin de produire du surnageant infectieux en culture cellulaire et ainsi pouvoir l'utiliser sur différentes populations de cellules du système immunitaire.

Puisqu'il a été démontré que le VHC pouvait interférer avec la reconnaissance du virus par les TLRs, nous avons dans un premier temps analysé la production de cytokines par les PBMCs mises en présence du virus et stimulés par différents TLRs. Ensuite, puisque les CD8 sont les CPA les plus efficaces et qu'elles sont capables de stimuler les LyT naïfs contre différents pathogènes, nous avons également analysé l'impact du VHC sur ces cellules. Finalement, par un système de co-cultures de MoCDs avec des hépatocytes infectés qui représente de manière plus réaliste ce qui peut se passer au niveau du foie de patients infectés, nous avons analysé l'effet du contact cellulaire entre ces deux populations de cellules sur les MoCDs.

## **1. INFECTION DES CELLULES HUH-7.5 PAR JFH1**

### **1.1 QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL ET DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE**

Lors de la production du virus en culture cellulaire, nous avons analysé par RT-PCR quantitatif la quantité d'ARN viral présent dans les surnageants (figure 5A) et déterminé le titre infectieux par dénombrement des foyers infectieux par immunofluorescence (figure 5B). À la figure 5A, nous pouvons voir que la quantité d'ARN viral dans les

surnageants est importante et ce, dès les premiers jours suivant l'infection et elle semble demeurer relativement constante. Cependant, nous avons observé une différence importante entre la quantité d'ARN viral et le titre infectieux (1000 copies d'ARN pour 1 particule infectieuse). Les résultats obtenus concordent avec ceux présentés dans la littérature (Wakita et al. 2005) et suggèrent que la production de particules infectieuses dans le système JFH1 génère plusieurs particules virales défectueuses. L'utilisation de certaines chimères de JFH1 peut permettre d'obtenir de meilleures productions de particules infectieuses en culture cellulaire, particulièrement la chimère J6/JFH1 qui contient les gènes des protéines Core à NS2 (voir figure 2) du clone infectieux J6CF (génotype 2a) et les gènes codant pour les protéines NS3 à NS5 de JFH1 (Pietschmann et al. 2006; Lindenbach et al. 2005). L'utilisation de cette chimère pourrait donc augmenter le titre infectieux des surnageants utilisés lors de nos études avec les cellules du système immunitaire.

## **1.2 L'INFECTION PAR JFH1 INDUIT L'APOPTOSE DANS LES CELLULES HUH-7.5**

Lors de la production du VHC en culture cellulaire, nous observions, lors des passages cellulaires, une diminution dans le nombre de cellules infectées comparativement aux cellules Huh-7.5 non infectées. La viabilité des cellules infectées a donc été analysée et comparée à celle des cellules non infectées aux différents temps p.i. dans le but de déterminer si l'infection par JFH1 a un effet sur la viabilité des cellules Huh-7.5. La figure 6 démontre que la viabilité des cellules Huh-7.5 infectées est significativement inférieure à celle des cellules non infectées dès le jour 6 p.i. et ce, jusqu'au jour 20 p.i.

Afin d'identifier le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la baisse de viabilité observée dans les cellules Huh-7.5 infectées par JFH1, nous avons comparé les niveaux d'apoptose dans ces cellules à ceux de cellules Huh-7.5 non infectées par ELISA (mesure de la fragmentation de l'ADN) et par cytométrie en flux. Les figures 7 et 8 démontrent que l'infection par JFH1 induit l'apoptose dans les cellules Huh-7.5 et ce, de manière statistiquement significative du jour 3 au jour 11 p.i. environ, puis par la suite les niveaux d'apoptose sont comparables entre les cellules infectées et non infectées. Par ailleurs, la

figure 8A démontre que la baisse de viabilité observée durant les premiers jours p.i. dans les cellules Huh-7.5 infectées semble être due à l'apoptose plutôt qu'à la nécrose puisque les pourcentages de cellules nécrotiques (7-AAD<sup>+</sup>) sont similaires entre les cellules infectées ou non (figure 8A et résultats non présentés).

Chez les patients infectés de façon chronique, des études ont démontré que l'apoptose était induite dans les hépatocytes (Bantel et al. 2001; Calabrese et al. 2000). Par contre, il n'est pas clair si l'apoptose observée est due à l'action du virus et/ou à la réponse immunitaire. Par ailleurs, les résultats d'études utilisant l'expression des protéines virales recombinantes du VHC dans des cellules hépatiques ont donné des résultats contradictoires quant aux propriétés pro- ou anti-apoptotiques des protéines virales. En effet, selon certaines de ces études, les protéines virales Core, E1, E2, NS3, NS4A, NS5A et NS5B induiraient l'apoptose, tandis que d'autres analyses démontrent que Core, E2, NS2, NS3 et NS5A seraient anti-apoptotiques (pour une revue de littérature complète voir (Fischer, Baumert, and Blum 2007)). Récemment, par l'utilisation du système JFH1 (Lan et al. 2008; Mateu et al. 2008; Sekine-Osajima et al. 2008) ou de la chimère J6/JFH1 décrite plus tôt (Deng et al. 2008; Mateu et al. 2008; Walters et al. 2009) des équipes ont pu démontrer que le virus entier induisait l'apoptose dans les cellules Huh-7.5 et ont analysé les mécanismes responsables de l'induction de l'apoptose. Nos résultats, démontrant que l'infection par JFH1 affecte la viabilité cellulaire en induisant l'apoptose dans les cellules Huh-7.5 concordent donc avec ces études. Bien qu'ils n'excluent pas la possibilité que l'apoptose observée dans le foie de patients infectés soit également due à la réponse immunitaire, nos résultats suggèrent que l'apoptose est due, du moins en partie, à la réplication du virus.

Selon nos résultats, l'apoptose induite par l'infection semble toutefois transitoire puisqu'à partir du jour 11 p.i. environ nous n'avons plus détecté d'apoptose ni par ELISA, ni par cytométrie en flux (figures 7 et 8). Parmi les études décrites ci-haut démontrant qu'il y avait apoptose lors de l'infection par JFH1 (ou J6/JFH1), d'autres équipes ont également démontré que l'apoptose induite est transitoire lors de l'infection par JFH1 et qu'elle persiste un peu plus longtemps dans le cas de l'infection par la chimère J6/JFH1 (Mateu

et al. 2008; Sekine-Osajima et al. 2008). Les autres équipes n'ont pas poursuivi l'analyse de l'apoptose au-delà de 72 heures p.i. Il est possible qu'il y ait adaptation du virus et/ou des cellules Huh-7.5 afin d'arrêter l'apoptose. Une analyse du génome viral par séquençage pourrait permettre de déterminer si des mutations au niveau du génome viral sont responsables de l'arrêt de l'apoptose. De plus, bien qu'il y ait apoptose, nous pouvons observer que la majorité des cellules infectées ne sont pas apoptotiques. En effet, selon nos résultats de cytométrie en flux (figure 8B) entre 5 et 20% seulement des cellules entrent en apoptose, alors que près de 70-75% des cellules sont infectées (résultats non présentés). Ce phénomène a également été observé par l'équipe de Deng avec le clone infectieux JFH1 (Deng et al. 2008), de même que chez les patients infectés où il a été observé qu'entre 0.54% et 20% des hépatocytes étaient en apoptose (Calabrese et al. 2000; Bantel et al. 2001), alors qu'il est évalué que dans le foie, entre 10 et 50% des hépatocytes peuvent être infectés par le virus (Agnello et al. 1998; Pardo et al. 2007; Vona et al. 2004). Il semblerait donc que l'induction de l'apoptose dans les hépatocytes ne soit pas généralisée. Par ailleurs, dans la présente étude, nous n'avons pas déterminé si seules les cellules infectées étaient en apoptose. Des expériences complémentaires pourraient nous permettre de déterminer si l'infection par JFH1 cause uniquement l'apoptose dans les cellules infectées ou si les cellules non infectées avoisinantes entrent également en apoptose. À l'aide d'anticorps dirigés contre la PS et la protéine virale NS5A, nous pourrions effectuer un double marquage et ainsi vérifier, par cytométrie en flux ou par microscopie confocale, quelles cellules sont apoptotiques.

Par ailleurs, lors de la production de VHC en culture cellulaire avec le système JFH1, bien que l'apoptose ne soit plus détectable dans les derniers jours de l'infection, nous avons tout de même observé une baisse significative de la viabilité cellulaire dans les cellules infectées comparativement aux cellules non infectées jusqu'au jour 20 p.i. (figure 6). L'équipe de Walters a démontré que l'infection par J6/JFH1 perturbait le cycle cellulaire et qu'il y avait moins de cellules en phase S du cycle cellulaire chez les cellules infectées comparativement aux cellules non infectées et qu'il y avait donc un délai dans la progression du cycle cellulaire chez les cellules infectées (Walters et al. 2009). Il est possible que les résultats que nous avons obtenus avec le test MTT du jour 10 au jour 20

p.i. soient dûs à ce phénomène (figure 6), puisque le test est basé sur la réduction du sel MTT en formazan par les cellules viables et métaboliquement actives. Ainsi, il est possible que les cellules infectées soient toujours viables à ces jours p.i., ce qui concorderait avec nos résultats sur l'apoptose (figures 7 et 8), mais que leur division cellulaire soit perturbée. Par ailleurs, nos résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres équipes qui ont observé des effets cytopathiques dans les cellules infectées par JFH1 jusqu'au jour 14 p.i. environ (Zhong et al. 2006).

## **2. L'APOPTOSE INDUITE DANS LES CELLULES HUH-7.5 LORS DE L'INFECTION PAR JFH1 AUGMENTE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES PBMCs STIMULÉES PAR LES LIGANDS DES TLRs**

Tel que mentionné précédemment, il a été démontré que certaines protéines du VHC peuvent interférer à de nombreux niveaux de la réponse immunitaire innée, notamment en bloquant certaines voies des TLRs (voir la revue de littérature, section 5.2.1). Dans le but de vérifier si tel est le cas dans notre système mimant l'infection aiguë, nous avons donc utilisé le surnageant de culture de cellules Huh-7.5 infectées par JFH1 comme source de virus et avons mis des PBMCs fraîchement isolées de donneurs sains en culture avec ces surnageants avant de les stimuler par différents ligands des TLRs impliqués dans la reconnaissance des virus. La production de différentes cytokines par les PBMCs a ensuite été analysée par ELISA afin de vérifier si la présence du virus pouvait inhiber ou stimuler la production de cytokines. Par ailleurs, nous avons comparé l'effet de surnageant infectieux provenant de cellules Huh-7.5 apoptotiques (J8 p.i.) et non apoptotiques (J17 p.i.).

Tout d'abord, en présence de surnageant infectieux, mais en absence de stimulation par les ligands des TLRs, aucune production de cytokines par les PBMCs n'a été observée (résultats non présentés). Cela suggère que la présence du virus seul n'est pas suffisante pour induire la production de cytokines par les PBMCs. Ces résultats concordent avec des études effectuées par d'autres équipes, qui ont démontré qu'en présence de JFH1, mais en absence de toute stimulation par les TLRs, il n'y avait pas de production d'IFN- $\alpha$ , de

TNF- $\alpha$ , d'IL-10 ou d'IL-12 par les PBMCs (Zhang et al. 2009; Shiina and Rehermann 2008).

La figure 9 démontre que de façon générale, l'apoptose induite durant les premiers jours p.i. dans les cellules Huh-7.5 augmente la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 par les PBMCs stimulées par les ligands des TLRs 2,3,4 et 7/8. En effet, lorsque nous avons utilisé du surnageant infectieux du jour 8 p.i. (provenant de cellules en apoptose), il y a une augmentation des cytokines produites comparativement au surnageant contrôle Mock provenant de cellules non apoptotiques et non infectées du même jour p.i. L'effet observé semble uniquement dû à l'apoptose puisque lorsqu'un surnageant infectieux ayant un titre viral similaire à celui du jour 8 p.i., mais ne provenant pas de cellules en apoptose est utilisé (surnageant du jour 17 p.i.), l'augmentation de la production de cytokines n'est plus observée. Il semble donc que le virus seul (sans apoptose) n'augmente pas la sécrétion de cytokines testées par les PBMCs, mais n'inhibe pas non plus cette production puisque les concentrations de cytokines observées sont relativement similaires entre le surnageant infectieux et le surnageant contrôle Mock (figure 9, jour 17 p.i.). Afin de confirmer que l'apoptose est responsable de l'augmentation de la production de cytokines par les PBMCs, nous pourrions utiliser du surnageant de cellules Huh-7.5 non infectées mais apoptotiques, en induisant l'apoptose dans ces cellules par irradiation aux UVs. Par ailleurs, nous pourrions confirmer que le virus seul n'a pas d'effet sur la production de cytokines en purifiant le surnageant infectieux avant de mettre les PBMCs en culture dans ce surnageant.

Parmi les composés qui pourraient se retrouver dans les surnageants infectieux provenant des cellules apoptotiques, il y a les microvésicules (MVs) qui sont des particules qui mesurent entre 100 et 1000 nm et qui proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique (Pap et al. 2009). Les MVs sont relâchées par pratiquement tous les types cellulaires (Pap et al. 2009; Distler et al. 2005) dont les hépatocytes (Pap et al. 2009). Les cellules peuvent relâcher de façon constitutive les MVs, mais leur sécrétion augmente lors de l'activation de la cellule ou de l'apoptose (Pilzer et al. 2005; Distler et al. 2005; Pap et al. 2009). Contrairement aux corps apoptotiques, les MVs sont relâchées rapidement au

début de l'apoptose et tel que mentionné, mesurent moins de 1  $\mu\text{m}$ . Les corps apoptotiques, quant à eux, sont relâchés dans les dernières étapes de l'apoptose et mesurent plus de 1  $\mu\text{m}$  (Pap et al. 2009). La composition des MVs est variable selon la cellule parentale qui les sécrète. Elles sont impliquées dans de nombreux processus, dont la coagulation, la fonction vasculaire, l'apoptose, la prolifération cellulaire et l'inflammation (Distler et al. 2005; Pap et al. 2009). Dans ce dernier cas, les MVs peuvent avoir un effet anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire selon leur provenance et les cellules immunitaires avec lesquelles elles interagissent (Distler et al. 2005; Ratajczak et al. 2006; Eken et al. 2008; Cocucci, Racchetti, and Meldolesi 2009). Par ailleurs, il est également possible que les surnageants que nous avons utilisés contenaient des exosomes, des vésicules de moins de 100 nm qui, contrairement aux MVs, ne proviennent pas de la membrane plasmique, mais plutôt de corps multivésiculaires intracellulaires qui sont relâchés par exocytose et qui, tout comme les MVs, peuvent avoir une influence sur les cellules du système immunitaire (Thery, Zitvogel, and Amigorena 2002; Valenti et al. 2007). Bien qu'aucune information ne soit disponible sur le relâchement de MVs ou d'exosomes par les cellules Huh-7.5 infectées par JFH1, il est possible qu'ils soient présents dans les surnageants de culture des cellules Huh-7.5 apoptotiques puisque leur taille ne permet pas nécessairement leur élimination par la filtration des surnageants. Si nous confirmons, par l'utilisation de surnageants provenant de cellules Huh-7.5 non infectées, mais apoptotiques le rôle de l'apoptose dans l'augmentation de la production de cytokines par les PBMCs, nous pourrions tenter de purifier ces MVs ou exosomes et confirmer ou infirmer leur rôle. En effet, l'isolation de ces composés est possible, notamment par ultracentrifugation (Pap et al. 2009).

Seule l'équipe de Shiina a mesuré la production de cytokines par les PBMCs en présence de JFH1 après stimulation par un ligand des TLRs, l'oligonucléotide CpG, un ligand du TLR-9. Selon leurs résultats, en présence du virus et après stimulation par le TLR-9, aucune différence n'a été observée quant à la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-10 ou d'IL-12 par les PBMCs comparativement au surnageant contrôle non infectieux. Par contre, ils ont observé une baisse significative de la production d'IFN- $\alpha$  par les PBMCs incubées avec le virus après la stimulation du TLR-9 (Shiina and Rehmann 2008). Bien que nous

n'ayons pas vérifié les mêmes TLRs, nos résultats concordent en partie avec ceux de l'équipe de Shiina, c'est-à-dire que le virus n'interfererait pas avec les voies de signalisation des TLRs étudiés (TLRs 2,3,4 et 7/8) sur les PBMCs puisqu'il ne diminue pas la production de certaines cytokines par ces cellules. Par contre, bien qu'ils aient également observé de l'apoptose lors de leur production de virus en culture cellulaire, l'équipe de Shiina n'a pas comparé des surnageants infectieux provenant de cellules apoptotiques ou non, comme nous l'avons fait dans la présente étude sur les PBMCs totales.

Tel que mentionné dans la revue de littérature (point 5.2.3), certaines études ont démontré qu'il pouvait y avoir association d'ARN viral avec certaines populations de cellules du système immunitaire chez les patients infectés de façon chronique, ce qui pourrait suggérer que le virus infecte ces cellules. Cependant, cette possibilité n'a jamais encore été démontrée. Dans le cadre de nos expériences, nous avons, à quelques reprises, vérifié par RT-PCR quantitatif s'il y avait ou non présence d'ARN viral dans les cellules du système immunitaire que nous avons utilisées dans nos expériences. Selon nos résultats, nous n'avons pas détecté la présence d'ARN viral, que ce soit pour les PBMCs ou les MoCDs (résultats non présentés), ce qui a également été démontré par une autre équipe (Ebihara et al. 2008) ce qui suggère que JFH1 n'infecte pas les cellules du système immunitaire.

### **3. EFFET DE JFH1 SUR LES CELLULES DENDRITIQUES GÉNÉRÉES À PARTIR DE MONOCYTES**

Les CD8 sont les CPA les plus efficaces et à la suite de leur maturation, elles peuvent présenter les antigènes aux LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et ainsi induire une réponse cellulaire adaptative. Puisque chez les patients infectés chroniquement par le VHC la réponse cellulaire nécessaire à l'élimination du virus est absente ou insuffisante, il est possible que le VHC inhibe les fonctions des CD8, ce qui pourrait expliquer l'incapacité à générer la réponse cellulaire. Tel que mentionné précédemment, les études portant sur l'état des CD8 chez les patients infectés de façon chronique sont très contradictoires et n'ont pu

démontrer un rôle clair du virus sur ces cellules. Par ailleurs, l'effet du virus sur les CD8 dans la phase aiguë de l'infection, au moment où le développement de la réponse immunitaire cellulaire est critique, demeure inconnu. Dans la présente étude, nous avons donc voulu évaluer l'effet du virus sur les CD8 dans un contexte qui mime l'infection aiguë.

### **3.1 JFH1 N'ALTÈRE PAS L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE MATURATION ET DE CO-STIMULATION DES MoCD8**

Des CD8 générées à partir de monocytes fraîchement isolés de sujets sains (MoCD8), ont été incubées avec du surnageant infectieux (provenant de cellules Huh-7.5 apoptotiques ou non) ou du surnageant contrôle Mock. À la suite de la maturation des MoCD8, nous avons analysé, par cytométrie en flux, l'expression de marqueurs de maturation des MoCD8 dans le but de déterminer si le virus pouvait inhiber la maturation de ces cellules.

Nos résultats démontrent que la présence du virus ne semble pas inhiber la maturation des MoCD8 (figures 10 et 11). En effet, pour chacun des marqueurs de maturation et de co-stimulation analysés (CD86, CD80, HLA-DR et CD83), l'expression sur les MoCD8 incubées avec du surnageant infectieux est comparable à celle observée sur les MoCD8 maturées sans la présence de surnageant de culture de cellules Huh-7.5 (MoCD8 matures) ou en présence de surnageant contrôle non infectieux (Mock) et supérieure à celle de MoCD8 immatures. De plus, les surnageants infectieux utilisés possédaient des titres viraux similaires, mais le surnageant du jour 11 p.i. provenait de cellules Huh-7.5 qui étaient en apoptose (figure 7B), tandis que le surnageant du jour 25 p.i. provenait de cellules Huh-7.5 infectées qui n'étaient plus en apoptose. Nous pouvons donc croire que ni le virus, ni l'apoptose induite par l'infection n'interfère avec la maturation des MoCD8.

Les résultats que nous avons obtenus concordent avec certaines études effectuées sur les CD8 isolées de patients en phase chronique d'infection. En effet, plusieurs études ont démontré que lorsque différents types de CD8 (mCD8, pCD8 et MoCD8) isolées de patients infectés chroniquement par le VHC étaient stimulées *in vitro* afin d'induire leur maturation, aucune différence dans l'expression des marqueurs de maturation n'était

observée (Yonkers et al. 2007; Fan et al. 2007; Longman et al. 2004; Piccioli et al. 2005; Liang et al. 2009). Par contre, d'autres études ont plutôt démontré que la maturation des CDs était altérée chez les patients et que l'expression des marqueurs de maturation analysés dans notre étude était réduite après maturation *in vitro* de ces cellules (Yonkers et al. 2007; Auffermann-Gretzinger, Keeffe, and Levy 2001; Miyatake et al. 2007), de même que les niveaux basaux d'expression de ces marqueurs (Kanto et al. 1999). Les résultats contradictoires entre ces études pourraient peut-être être expliqués par le fait que les types de CDs (mCDs, pCDs et MoCDs), de même que les cocktails de maturation utilisés diffèrent entre les études.

Ces résultats ont été obtenus à partir de CDs isolées de patients qui sont en phase chronique d'infection et ne reflètent donc pas nécessairement ce qui se passe lors de la phase aiguë de l'infection. Il est donc difficile de comparer nos résultats avec ceux de ces études puisque nous avons voulu mimer l'infection aiguë. Comme nous, d'autres équipes ont également analysé l'effet de JFH1 sur la maturation des CDs. Tout comme lors des études sur les CDs de patients infectés de manière chronique, les résultats sont contradictoires. Tout d'abord, certains ont démontré que la présence du virus n'altérait pas l'expression des marqueurs de maturation sur différents types de CDs dont les MoCDs (Ebihara et al. 2008; Shiina and Rehermann 2008; Liang et al. 2009), ce qui concorde avec les résultats que nous avons obtenus. Une étude a également démontré que JFH1 pouvait augmenter l'expression de CD83, CD86 et CD40 (Liang et al. 2009). Cependant, d'autres équipes ont plutôt démontré que JFH1 inhibait l'expression de certains marqueurs de maturation sur différentes populations de CDs, dont les pCDs (Gondois-Rey et al. 2009; Liang et al. 2009) et les MoCDs (Saito et al. 2008). Les différences observées pourraient encore une fois s'expliquer par l'utilisation de différents types de CDs. Par ailleurs, la quantité de virus utilisée varie d'une étude à une autre, ce qui pourrait également expliquer les différences entre les résultats obtenus. Par exemple, l'équipe de Liang a démontré que l'augmentation de l'expression des marqueurs de maturation qu'ils ont observée sur les MoCDs incubées avec du surnageant infectieux est présente à une MOI de 10, mais pas lorsqu'une MOI de 1 est utilisée (Liang et al. 2009). Dans notre cas, comme la production de virus en culture cellulaire nous a donné des titres

infectieux peu élevés (voir point 1.1 de la présente section), nous n'avons pu utiliser une MOI supérieure à 0.01. Les équipes qui comme nous ont démontré que la présence de JFH1 n'altérait pas l'expression des marqueurs de maturation sur les différentes populations de CDs, ont utilisé des MOI variant entre 0.01 et 10. Ceux qui ont démontré, contrairement à nous, que la présence du virus inhibait l'expression des marqueurs de maturation sur les CDs ont utilisé des MOI allant de 0.01 à 0.1 (Saito et al. 2008; Gondois-Rey et al. 2009). Comme nous avons obtenu des résultats différents en utilisant une MOI semblable à celle utilisée dans ces études, il est peu probable que nous ayons manqué l'effet inhibiteur du virus. Cependant, afin de confirmer nos résultats qui démontrent que le virus n'inhibe pas la maturation des MoCDs, nous pourrions augmenter la charge virale dans nos surnageants infectieux, en utilisant la chimère J6/JFH1 pour la production de virus ou en concentrant nos surnageants infectieux et voir par la suite si nous obtenons les mêmes résultats.

### **3.2 LA FONCTION ALLOSTIMULATRICE DES MoCDs N'EST PAS AFFECTÉE PAR JFH1**

Chez les patients infectés de façon chronique il a été démontré que dans certains cas, la fonction allostimulatrice des CDs était altérée (Auffermann-Gretzinger, Keeffe, and Levy 2001; Kanto et al. 2004; Bain et al. 2001; Tsubouchi et al. 2004; Yonkers et al. 2007). Nous avons donc voulu vérifier si dans notre système mimant l'infection aiguë, JFH1 pouvait altérer cette fonction. La figure 12 démontre qu'en présence de surnageant infectieux provenant de cellules apoptotiques (J11 p.i., figure 12A) ou en présence de surnageant infectieux seulement (J25 p.i., figure 12B), la fonction allostimulatrice des MoCDs n'est pas affectée.

Les résultats provenant d'études effectuées chez les patients infectés de manière chronique ne démontrent, dans certains cas, aucune différence significative entre la capacité allostimulatrice des CDs isolées de patients infectés et celle de donneurs sains (Fan et al. 2007; Piccioli et al. 2005; Longman et al. 2004), alors que d'autres ont démontré que cette capacité était diminuée (Tsubouchi et al. 2004; Kanto et al. 2004; Kanto et al. 1999; Auffermann-Gretzinger, Keeffe, and Levy 2001; Bain et al. 2001;

Yonkers et al. 2007). Certaines études ont également démontré que lorsque les CD4 de patients atteints chroniquement du VHC sont mises en contact avec des LyT allogéniques, ces derniers produisaient moins d'IFN- $\gamma$  (Kanto et al. 2004; Yonkers et al. 2007; Kanto et al. 1999) ce qui pourrait suggérer que chez certains patients, les CD4 polarisent la réponse  $T_H$  vers un type  $T_{H2}$  plutôt que  $T_{H1}$ . Comme la réponse immunitaire cellulaire est responsable de l'élimination du VHC, la polarisation vers une réponse de type  $T_{H1}$  est cruciale dans le cas de l'infection par le VHC. Dans la présente étude, nous n'avons pas mesuré la production d'IFN- $\gamma$  (réponse de type  $T_{H1}$ ) ou d'IL-4 (réponse de type  $T_{H2}$ ) lors de nos expériences de MLR, mais il serait intéressant de le faire afin de déterminer si les MoCDs incubées avec du surnageant infectieux induisent davantage l'une des deux réponses malgré le fait que leur fonction allostimulatrice ne soit pas altérée par la présence du virus.

Nos résultats démontrant que JFH1 n'a pas d'effet sur la capacité allostimulatrice des MoCDs concordent avec ceux obtenus par d'autres équipes (Shiina and Rehmann 2008; Ebihara et al. 2008). D'un autre côté, bien que l'équipe de Liang n'ait pas quantifié la prolifération des LyT allogéniques dans la MLR par incorporation de la  $^3H$ thymidine comme nous l'avons fait, ils ont démontré qu'en présence de JFH1, les mCDs et pCDs diminuaient l'activation des LyT CD4<sup>+</sup>, ce qui se traduisait par une diminution de la production d'IFN- $\gamma$  par ces cellules (Liang et al. 2009).

### **3.3 JFH1 AUGMENTE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES MoCDs**

Finalement, afin de compléter notre étude sur l'effet de JFH1 sur les MoCDs, nous avons quantifié la production de cytokines par ces cellules à la suite de leur maturation. Nous désirions voir si la présence du virus pouvait inhiber la production de cytokines immunomodulatrices dans un contexte mimant l'infection aiguë et ainsi vérifier si la diminution de cytokines par les CD4, qui a parfois été observée chez les patients infectés de façon chronique par le VHC (Kanto et al. 1999; Kanto et al. 2004; Dolganiuc et al. 2006; Rodrigue-Gervais et al. 2007), se produisait également dans notre modèle expérimental d'infection aiguë.

Selon la figure 13B, il semble que la présence du virus seul sans apoptose (J25 p.i.), augmente de façon significative la production d'IL-12, de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 par les MoCDs, comparativement aux MoCDs incubées avec le surnageant contrôle Mock. Par contre, la figure 13A démontre qu'en présence du virus et d'apoptose (J11 p.i.) aucune différence significative n'est observée dans la production des cytokines par les MoCDs. Si l'on compare les résultats obtenus en utilisant ces surnageants provenant de jours p.i. différents, cela pourrait signifier que le virus induit une augmentation de la production de cytokines par les MoCDs, mais que cet effet serait inhibé par la présence d'apoptose induite par le virus. Afin de confirmer ces observations, nous pourrions utiliser du surnageant de cellules Huh-7.5 non infectées, mais apoptotiques et vérifier s'il y a bel et bien une diminution de la production de cytokines par les MoCDs. Une fois de plus, la présence de MVs produites dans le surnageant par les cellules Huh-7.5 apoptotiques ou la présence d'exosomes pourrait peut-être expliquer la diminution de cytokines produites par les MoCDs. En effet, il a été démontré que de telles particules peuvent inhiber la production de cytokines par les MoCDs (Eken et al. 2008).

Plusieurs études ont démontré une baisse de la production de cytokines par les pCDs chez les patients infectés chroniquement, principalement au niveau de l'IFN- $\alpha$  (Averill, Lee, and Karandikar 2007; Anthony et al. 2004; Yonkers et al. 2007; Kanto et al. 2004). Par contre, d'autres équipes ont montré que les pCDs sécrétaient des concentrations similaires d'IFN- $\alpha$  à celles produites par les pCDs de sujets sains (Longman et al. 2005; Piccioli et al. 2005; Wertheimer, Bakke, and Rosen 2004). Par ailleurs, lorsque des pCDs isolées de sujets sains sont mises en présence de JFH1, puis stimulées *in vitro*, une fois de plus, les résultats sont contradictoires quant à la production d'IFN- $\alpha$ . Certains ont démontré que la présence de JFH1 diminuait les quantités d'IFN- $\alpha$  et de TNF- $\alpha$  produites par ces cellules (Gondois-Rey et al. 2009; Shiina and Rehmann 2008). De plus, selon ces études, il semblerait que la baisse d'IFN- $\alpha$  serait uniquement due au virus et non à l'apoptose induite par l'infection de JFH1 dans les cellules Huh-7.5, puisqu'en présence de surnageant de cellules Huh-7.5 apoptotiques, mais non infectées, la baisse de production d'IFN- $\alpha$  n'a plus été observée. Ces équipes ont également prouvé que l'effet observé était dépendant de la charge virale. D'un autre côté, d'autres ont montré que la présence du

virus ne diminuait pas la production de ces cytokines par les pCDs (Decalf et al. 2007) et même que la présence de JFH1 pouvait augmenter la production de TNF- $\alpha$  par les pCDs (Liang et al. 2009). Les pCDs étant en nombre relativement peu élevé dans le sang, nous n'avons malheureusement pas pu étudier l'effet de JFH1 sur ces cellules étant donné les faibles quantités de sang que nous obtenions pour chaque donneur.

En ce qui concerne les mCDs ou les MoCDs, encore une fois, les résultats publiés dans la littérature concernant la production de cytokines sont contradictoires, autant pour les études effectuées chez des patients infectés de façon chronique par le VHC que pour les études faites avec JFH1 (ou la chimère J6/JFH1). Tout d'abord, il a été démontré que chez les patients infectés chroniquement, ces cellules produisaient moins de cytokines que les cellules de sujets sains lorsqu'elles étaient stimulées *in vitro*. En effet, une baisse dans la production d'IL-12 a souvent été observée (Averill, Lee, and Karandikar 2007; Anthony et al. 2004; Fan et al. 2007; Kanto et al. 2004; Rodrigue-Gervais et al. 2007), de même qu'une augmentation d'IL-10 (Averill, Lee, and Karandikar 2007) ce qui pourrait suggérer un problème dans la maturation des CD4 et dans l'activation et la polarisation de la réponse T. Par contre, ces résultats n'ont pas été observés par d'autres équipes. En effet, selon certaines études, il n'y aurait aucune différence significative dans la production de cytokines entre les CD4 de patients infectés et celles de sujets sains, que ce soit pour l'IL-12, le TNF- $\alpha$  ou l'IL-10 (Piccioli et al. 2005; Kanto et al. 1999) ou encore que la diminution dans la production de cytokines n'était pas observée chez tous les patients atteints (Rodrigue-Gervais et al. 2007). Chez les équipes qui ont utilisé le système JFH1, peu d'équipes ont mesuré la production de cytokines par les mCDs et MoCDs. Aucune différence n'a été détectée dans la production de cytokines lorsque les cellules ont été incubées avec du surnageant infectieux JFH1, comparativement au surnageant de cellules Huh-7.5 non infectées (Liang et al. 2009; Shiina and Rehermann 2008). Une partie de nos résultats, c'est-à-dire lorsque nous avons utilisé du surnageant infectieux provenant de cellules apoptotiques (figure 13A), concorde donc avec ces études. Par contre, il n'est pas clairement indiqué, du moins dans le cas de l'équipe de Liang, si leur surnageant provenait de cellules en apoptose ou non, ce qui rend plus difficile la comparaison avec nos résultats. Par contre, l'équipe de Shiina mentionne

qu'ils ont utilisé du surnageant provenant de cellules Huh-7.5 apoptotiques, mais ils n'ont pas analysé la production de cytokines par les MoCDs en utilisant du surnageant infectieux provenant de cellules non apoptotiques. À ce jour, nous semblons être la seule équipe à avoir observé une augmentation significative dans la production de cytokines par les MoCDs en présence de JFH1, mais en absence d'apoptose.

Les diverses expériences que nous avons effectuées sur les MoCDs semblent donc démontrer que la présence du virus n'altère pas les fonctions de ces cellules, à savoir leur maturation, leur capacité allostimulatrice ou la production de cytokines. Par contre, cette dernière fonction semble être partiellement altérée par l'apoptose induite par l'infection dans les hépatocytes. Afin de confirmer cette observation, d'autres analyses seront à effectuer en incubant les MoCDs avec du surnageant de cellules non infectées et apoptotiques avant de mesurer la production de cytokines.

#### **4. LA PRÉSENCE DE CELLULES HUH-7.5 APOPTOTIQUES INDUIT UNE CERTAINE MATURATION DES MoCDs**

L'architecture particulière du foie fait en sorte que les hépatocytes infectés sont en contact étroit avec les cellules du système immunitaire (Bertolino, Klimpel, and Lemon 2000). Puisque nous avons préalablement démontré que l'infection par le VHC induisait l'apoptose dans les cellules Huh-7.5 *in vitro* et qu'il a également été observé qu'il y avait apoptose dans les hépatocytes de patients infectés (Bantel et al. 2001; Calabrese et al. 2000), nous avons voulu vérifier si la présence de cellules infectées et/ou apoptotiques pouvait avoir un effet sur les cellules du système immunitaire présentes dans le foie et qui sont en contact avec les hépatocytes infectés. Pour ce faire, nous avons mis en co-cultures des cellules Huh-7.5 infectées ou non infectées, apoptotiques ou non apoptotiques en présence de MoCDs immatures. Nous avons ensuite analysé l'expression des marqueurs de maturation et de co-stimulation par cytométrie en flux, afin de déterminer si le contact cellulaire pouvait induire la maturation des MoCDs.

La figure 14B démontre que la présence des cellules Huh-7.5 infectées et apoptotiques induit une certaine maturation des MoCDs. En effet, nous avons observé une augmentation (significative dans le cas de CD86) de l'expression des marqueurs de maturation sur les MoCDs cultivées en présence des cellules apoptotiques infectées par JFH1 comparativement aux MoCDs cultivées avec des cellules Huh-7.5 non infectées et non apoptotiques (Mock). Puisque nous observons la même augmentation dans l'expression des marqueurs sur les MoCDs lorsque ces dernières sont mises en co-cultures avec des cellules Huh-7.5 non infectées, mais rendues apoptotiques par irradiation aux UVs, nous pouvons affirmer que la présence de cellules apoptotiques induit une certaine maturation des MoCDs (figure 14A).

Nous avons confirmé que l'effet que nous avons observé est dû uniquement à l'apoptose induite par l'infection et non à l'infection elle-même. En effet, lorsque les MoCDs sont mises en co-cultures avec des cellules du jour 23 p.i., nous observons que la maturation est uniquement visible lorsque les MoCDs sont mises en présence de cellules Huh-7.5 non infectées et apoptotiques (figure 15B). En effet, dans ce cas l'expression des marqueurs de maturation et de co-stimulation est significativement plus élevée uniquement lorsque les MoCDs sont cultivées avec des cellules Huh-7.5 non infectées apoptotiques comparativement aux co-cultures effectuées avec des cellules non infectées (Mock) ou avec des cellules infectées, mais non apoptotiques (JFH1).

Nos résultats concordent avec ceux de l'équipe de Shiina qui ont également démontré une augmentation de l'expression de CD80, CD83 et CD86 lorsque les MoCDs sont mises en culture avec des cellules Huh-7.5.1 apoptotiques infectées par JFH1, comparativement aux co-cultures effectuées avec des cellules Huh-7.5.1 non infectées et non apoptotiques (Shiina and Rehmann 2008). Ils ont également démontré que cette augmentation de l'expression des marqueurs de maturation était due à l'apoptose et non à la présence du virus puisqu'ils ont observé une augmentation similaire de CD80 et CD83 sur les MoCDs lorsqu'elles étaient mises en culture avec des cellules Huh-7.5.1 apoptotiques, mais non infectées. Par contre, l'équipe d'Ebihara a quant à elle démontré que l'augmentation de l'expression de CD86 qu'ils ont observée lors de la co-culture de MoCDs avec des

cellules Huh-7 apoptotiques infectées par JFH1 n'est pas due principalement à l'apoptose des cellules Huh-7, mais plutôt au virus. En effet, l'augmentation de l'expression de CD86 observée sur les MoCDs lorsque ces dernières étaient cultivées en présence de cellules Huh-7 apoptotiques, mais non infectées n'était pas aussi élevée (mais tout de même présente) que lorsque la co-culture était faite avec les cellules infectées (Ebihara et al. 2008). Leurs résultats démontrent donc, contrairement à nous, que bien que l'apoptose induite par l'infection génère une certaine augmentation de l'expression des marqueurs de maturation (dans ce cas-ci CD86), elle n'est pas l'unique responsable de cette augmentation. Nous n'avons pas utilisé la même méthode que cette équipe pour induire l'apoptose dans les cellules Huh-7.5 non infectées et il est possible que les divergences de résultats soient expliquées en partie par ce fait et également par le fait que nous avons utilisé des cellules différentes que ces équipes (Huh-7.5.1, Huh-7.5 ou Huh-7). Par ailleurs, nous devons répéter l'expérience afin de confirmer nos résultats. Il serait également intéressant d'utiliser le système d'infection de la chimère J6/JFH1 qui induit un plus haut taux d'apoptose (Mateu et al. 2008) dans nos co-cultures afin de vérifier si cela aurait un effet sur la maturation des MoCDs.

Si nous comparons l'expression des marqueurs de maturation sur les MoCDs mises en co-cultures avec les cellules Huh-7.5 (figures 14B et 15B) à celle obtenue lorsque les MoCDs sont maturées avec le cocktail de maturation LPS + CD40L (figures 10 et 11) nous pouvons observer que la maturation induite par le contact cellulaire avec les cellules Huh-7.5 apoptotiques infectées ou non est largement inférieure à celle induite par le cocktail de maturation. Il serait donc intéressant de vérifier si ces MoCDs produisent des cytokines (i.e. IL-12p70, TNF- $\alpha$  et IL-10) à des niveaux comparables à ceux obtenus avec le cocktail de maturation et si elles sont capables de stimuler des LyT. En effet, les imCDs sont incapables de stimuler les LyT, résultant en l'anergie de ces cellules ou en l'induction de LyT<sub>REG</sub>, ce qui mène à la tolérance immunologique (Jonuleit et al. 2000). Tel que mentionné dans la revue de littérature (point 3.3), afin d'être efficacement aptes à stimuler les LyT, les CD doivent d'abord subir le processus de maturation. Une troisième population de CD, appelées semi-matures, expriment le CHM II et les molécules de co-stimulation, mais ne produisent pas (ou en faible quantité) de cytokines

pro-inflammatoires et sont, comme les imCDs, tolérigéniques (Lutz and Schuler 2002). Ainsi, en absence de stimuli de maturation adéquat, la maturation des CDs est incomplète et les CDs sont donc tolérigéniques plutôt qu'immunogéniques (Gogolak et al. 2003). La production de cytokines par les CDs matures semble donc être cruciale pour stimuler les LyT (Lutz and Schuler 2002; Blankenstein and Schuler 2002).

Les CDs immatures sont capables de phagocyter les cellules apoptotiques (Rubartelli, Poggi, and Zocchi 1997; Albert et al. 1998; Sauter et al. 2000). Par contre, il semblerait que la phagocytose de cellules apoptotiques par les CDs n'induit pas la maturation de ces dernières, contrairement à la phagocytose de cellules nécrotiques ce qui pourrait mener à l'induction de la tolérance immunitaire (Sauter et al. 2000). Dans le cas des MoCDs et des cellules Huh-7.5 infectées par JFH1 et apoptotiques, il semblerait que les MoCDs phagocytent les cellules infectées (Shiina and Rehermann 2008). Ainsi, il pourrait donc être normal que nous n'ayons observé qu'une maturation partielle des MoCDs dans nos co-cultures, ce qui pourrait peut-être expliquer l'incapacité de certains patients infectés par le VHC à générer une réponse cellulaire adéquate, puisque la maturation des CDs est l'une des étapes primordiales dans l'activation des LyT. Dans ce cas, la présence d'hépatocytes infectés en apoptose dans le foie n'induirait pas la maturation complète des CDs qui sont en contact avec ces hépatocytes. Par ailleurs, il a été démontré que la phagocytose de cellules apoptotiques par les CDs pouvait inhiber la maturation subséquente des CDs induite par un signal de maturation tel que le LPS (Urban, Willcox, and Roberts 2001; Stuart et al. 2002). Cependant, d'autres études ont démontré que les CDs pouvaient mûrir complètement si un signal de maturation était présent à la suite de la phagocytose de cellules apoptotiques (Albert et al. 1998; Sauter et al. 2000). Il serait donc intéressant de vérifier dans notre modèle d'infection aiguë du VHC lors de nos expériences de co-cultures, si les MoCDs qui ont été mises en contact avec des cellules Huh-7.5 infectées et apoptotiques répondent encore à la maturation induite par le LPS et le CD40L (expression de marqueurs de maturation, production de cytokines et capacité allostimulatrice). L'IFN- $\alpha$  peut également induire la maturation des CDs (Theofilopoulos et al. 2005) et cette cytokine est produite au niveau du foie chez les chimpanzés infectés de façon aiguë par le VHC (Thimme et al. 2002; Bigger et al. 2004).

Bien qu'il n'est pas connu si le même phénomène a lieu dans le foie de patients infectés, il serait pertinent de vérifier dans nos systèmes de co-cultures, si les MoCDs peuvent maturer en présence d'IFN- $\alpha$  ou si la présence des cellules Huh-7.5 apoptotiques inhibent la maturation des MoCDs. Ainsi, nous aurions une idée encore plus représentative de ce qui peut se passer au niveau du foie lors de l'infection aiguë par le VHC.

Tel que mentionné dans la revue de littérature (section 3.3) le processus de maturation des CDs peut être initié par différents éléments tels que la présence de pathogènes, d'inflammation, de dommages tissulaires ou encore via des cytokines pro-inflammatoires (Guermonprez et al. 2002). Bien que certains des récepteurs exprimés à la surface des CDs et impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques (tels  $\alpha_v\beta_5$  et CD36) soient connus (Albert et al. 1998), le mécanisme par lequel les cellules apoptotiques pourraient induire la maturation des CDs demeure encore inconnu à ce jour. Des signaux relâchés par les cellules apoptotiques ou encore des molécules exprimées à la surface de ces cellules pourraient induire la maturation des CDs. Une étude récente a d'ailleurs démontré que les cellules apoptotiques relâchent dans leur milieu environnant des nucléotides qui provoquent le recrutement de cellules phagocytaires (Elliott et al. 2009).

Les CDs qui ont phagocyté des cellules apoptotiques peuvent présenter les antigènes provenant de ces cellules aux LyT CD4<sup>+</sup> (Inaba et al. 1998) et CD8<sup>+</sup> (Albert, Sauter, and Bhardwaj 1998; Albert et al. 1998; Sauter et al. 2000). Plus spécifiquement, les CDs incubées avec des cellules apoptotiques infectées par des virus présentent, par le mécanisme de la présentation croisée, des antigènes viraux aux LyT CD8<sup>+</sup> (Arrode et al. 2000; Larsson et al. 2001; Fonteneau et al. 2003). Tel que mentionné précédemment, la structure particulière du foie permet le contact direct entre les hépatocytes infectés et apoptotiques et les cellules du système immunitaire. Afin de vérifier si les CDs qui ont été mises en co-cultures avec les hépatocytes infectés et apoptotiques sont capables de présenter les antigènes du VHC aux LyT et de les activer, nous pourrions isoler les MoCDs des co-cultures et les mettre en présence de LyT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> spécifiques au

VHC et vérifier leur fonctionnalité, par exemple en mesurant par ELISPOT la production d'IFN- $\gamma$  ou par des tests de cytotoxicité.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Vingt ans après sa découverte, le virus de l'hépatite C représente encore aujourd'hui un problème de santé majeur, avec près de 80% des individus qui développent une infection persistante qui peut mener à des pathologies importantes du foie, tels la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. À ce jour, aucun vaccin n'a encore été développé et les raisons pour lesquelles la majorité des individus infectés sont incapables de générer une réponse immunitaire cellulaire nécessaire à l'élimination du virus sont encore inconnues. Puisque l'élaboration d'une réponse cellulaire efficace nécessite la présentation des antigènes viraux aux LyT, l'hypothèse de notre projet de recherche est que le virus interfère avec les fonctions des cellules du système immunitaire, plus particulièrement au niveau des CD4 qui sont les CPA les plus efficaces. Certaines études effectuées chez les patients en phase chronique d'infection par le VHC semblent d'ailleurs démontrer des pertes de fonction chez les CD4, notamment au niveau de leur processus de maturation, de la production de cytokines immunomodulatrices et de leur fonction allostimulatrice (Kanto et al. 1999; Bain et al. 2001; Auffermann-Gretzinger, Keeffe, and Levy 2001; Kanto et al. 2004; Rodrigue-Gervais et al. 2007; Yonkers et al. 2007). Cependant, des résultats contradictoires ont également été démontrés (Wertheimer, Bakke, and Rosen 2004; Longman et al. 2004; Longman et al. 2005; Piccioli et al. 2005). Par ailleurs, peu de données existent quant à l'effet du virus sur les cellules du système immunitaire dans la phase aiguë de l'infection, au moment où l'élaboration de la réponse cellulaire T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> a lieu. Le but de notre projet de recherche était donc d'analyser l'impact du virus sur les cellules du système immunitaire dans un contexte qui mime l'infection aiguë.

Afin de vérifier notre hypothèse de recherche, du virus a été produit en culture cellulaire par l'utilisation du clone infectieux JFH1 et les surnageants infectieux ont ensuite été utilisés *in vitro* sur différentes populations de cellules immunitaires et les fonctions de ces cellules ont été analysées. La production de cytokines par les cellules mononucléées du sang périphérique après stimulation par différents ligands des TLRs impliqués dans la reconnaissance des virus a été quantifiée. La maturation, la production de cytokines et la fonction allostimulatrice des CD4 mises en présence du virus ont également été analysées. Finalement, des expériences de co-cultures de cellules infectées par le virus et des CD4 ont été effectuées afin de comprendre l'influence du contact cellulaire sur les CD4.

Lors de la caractérisation de l'infection d'une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain (cellules Huh-7.5) par JFH1, les résultats obtenus démontrent que le virus induit l'apoptose dans les cellules infectées dans les premiers jours de l'infection, ce qui se traduit par une baisse significative de la viabilité cellulaire. Ces résultats permettent de croire que l'apoptose observée dans le foie de patients infectés par le VHC est due en partie à la réplication du virus, mais n'excluent pas la possibilité que la réponse immunitaire générée au niveau du foie soit également responsable de l'apoptose d'hépatocytes. Combinés, ces deux phénomènes pourraient contribuer à la mort cellulaire observée, ce qui pourrait avoir un impact sur les cellules du système immunitaire.

Les expériences sur la production de cytokines par les PBMCs mises en présence de surnageants infectieux et stimulées par des ligands des TLRs démontrent que le virus n'interfère pas avec la signalisation des TLRs dans ces cellules et la production subséquente de cytokines. Cependant, selon nos résultats, l'apoptose induite par l'infection des hépatocytes augmente la production de cytokines. Cet effet reste à confirmer par l'utilisation de surnageants provenant de cellules apoptotiques, mais non infectées. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer, par cytométrie en flux, la population cellulaire responsable de l'augmentation des cytokines produites en présence de surnageant infectieux provenant de cellules en apoptose. De plus, une plus grande variété de cytokines pourrait être analysée par la technologie Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

Les résultats des expériences effectuées sur les MoCDs démontrent quant à eux que le VHC, dans un contexte qui mime l'infection aiguë, ne bloque pas leur maturation ni leur fonction allostimulatrice comme il a parfois été démontré chez les patients infectés de façon chronique. Cependant, le virus semble augmenter la production de cytokines immunomodulatrices. Dans ce dernier cas, la présence d'apoptose inhibe l'augmentation de la production de cytokines induite par la présence du virus. Les expériences seront à reproduire en présence de surnageant de cellules Huh-7.5 non infectées, mais apoptotiques afin de déterminer si dans ces surnageants se trouve un élément produit par les cellules apoptotiques qui influencerait la production de cytokines par les MoCDs ou

en utilisant du surnageant infectieux purifié afin de confirmer que le virus seul induit bel et bien une augmentation de la production de cytokines testées. Par ailleurs, le dosage de cytokines (IFN- $\gamma$  et IL-4) produites par les PBMCs allogéniques mises en présence des MoCDs qui ont été incubées avec du surnageant infectieux dans les expériences sur la fonction allostimulatrice nous permettront également d'analyser la polarisation de la réponse T par les MoCDs. De plus, bien que la fonction allostimulatrice soit souvent utilisée dans la littérature afin d'analyser l'état général des CD, elle n'est pas nécessairement représentative de la présentation antigénique. Nous pourrions donc vérifier si les MoCDs incubées en présence des différents surnageants sont aptes à activer des clones T spécifiques au VHC.

Finalement, nos résultats démontrent que le contact cellulaire entre des cellules Huh-7.5 infectées et apoptotiques ou seulement apoptotiques et les MoCDs induit une certaine maturation des MoCDs, alors que cet effet n'est pas observé lorsque des cellules infectées non apoptotiques sont utilisées, démontrant ainsi que l'apoptose est responsable de la maturation observée. Il serait maintenant intéressant d'analyser la fonctionnalité des MoCDs mises en contact avec les cellules Huh-7.5. Dans un premier temps, nous pourrions vérifier si elles sont capables de murer complètement à la suite d'un stimulus de maturation ou si au contraire, la présence de cellules apoptotiques bloque cette maturation. La fonction allostimulatrice, la production de cytokines ou la capacité à présenter les antigènes du VHC aux LyT devront également être analysées. Le fait qu'un contact cellulaire entre les hépatocytes infectés apoptotiques et les CD puisse inhiber une de ces fonctions des CD pourrait peut-être expliquer l'incapacité de certains individus à générer la réponse T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. En effet, tel que mentionné précédemment il y a présence, dans le foie de patients infectés, d'apoptose dans les hépatocytes et comme le foie est un organe où les cellules infectées et apoptotiques sont en contact avec les cellules du système immunitaire dont les CD, la présence d'hépatocytes apoptotiques pourrait inhiber la maturation complète des CD et donc induire la tolérance au VHC par la génération de LyT anergiques ou T<sub>REG</sub>. Des hépatocytes apoptotiques et infectés provenant de biopsies du foie de patients infectés par le VHC pourraient également être

utilisés afin de déterminer l'impact de ceux-ci sur les cellules du système immunitaire infiltrant le foie.

Dans l'ensemble, notre étude sur l'impact du VHC dans un contexte mimant l'infection aiguë démontre que le virus seul ne semble pas avoir d'effet inhibiteur sur les cellules du système immunitaire. Quelques autres équipes ont comme nous analysé l'effet de JFH1 sur les cellules immunitaires, cependant nous semblons être les seuls à avoir analysé, pour chacune des populations de cellules immunitaires étudiées, l'effet de l'apoptose induite par la réplication du virus. De plus, nous démontrons que cette apoptose semble affecter les cellules du système immunitaire et que dans les cas des CDs, elle pourrait avoir un effet plus important que le virus lui-même. Bien que d'autres études seront nécessaires afin de confirmer le rôle de l'apoptose dans l'incapacité des individus à générer une réponse cellulaire efficace pour éliminer le virus, elle représente une piste intéressante à suivre dans la compréhension de cette infection.

## **LISTE DES RÉFÉRENCES**

- ADAMS, S., D. W. O'NEILL, AND N. BHARDWAJ. 2005. RECENT ADVANCES IN DENDRITIC CELL BIOLOGY. *J CLIN IMMUNOL* 25 (3):177-88.
- AGNELLO, V., G. ABEL, M. ELFAHAL, G. B. KNIGHT, AND Q. X. ZHANG. 1999. HEPATITIS C VIRUS AND OTHER FLAVIVIRIDAE VIRUSES ENTER CELLS VIA LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR. *PROC NATL ACAD SCI USA* 96 (22):12766-71.
- AGNELLO, V., G. ABEL, G. B. KNIGHT, AND E. MUCHMORE. 1998. DETECTION OF WIDESPREAD HEPATOCYTE INFECTION IN CHRONIC HEPATITIS C. *HEPATOLOGY* 28 (2):573-84.
- AKIRA, S., S. UEMATSU, AND O. TAKEUCHI. 2006. PATHOGEN RECOGNITION AND INNATE IMMUNITY. *CELL* 124 (4):783-801.
- ALBERT, M. L., J. DECALF, AND S. POL. 2008. PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS MOVE DOWN ON THE LIST OF SUSPECTS: IN SEARCH OF THE IMMUNE PATHOGENESIS OF CHRONIC HEPATITIS C. *J HEPATOL* 49 (6):1069-78.
- ALBERT, M. L., S. F. PEARCE, L. M. FRANCISCO, B. SAUTER, P. ROY, R. L. SILVERSTEIN, AND N. BHARDWAJ. 1998. IMMATURE DENDRITIC CELLS PHAGOCYTOSE APOPTOTIC CELLS VIA ALPHAVBETA5 AND CD36, AND CROSS-PRESENT ANTIGENS TO CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES. *J EXP MED* 188 (7):1359-68.
- ALBERT, M. L., B. SAUTER, AND N. BHARDWAJ. 1998. DENDRITIC CELLS ACQUIRE ANTIGEN FROM APOPTOTIC CELLS AND INDUCE CLASS I-RESTRICTED CTLs. *NATURE* 392 (6671):86-9.
- ALEXOPOULOU, L., A. C. HOLT, R. MEDZHITOV, AND R. A. FLAVELL. 2001. RECOGNITION OF DOUBLE-STRANDED RNA AND ACTIVATION OF NF-KAPPAB BY TOLL-LIKE RECEPTOR 3. *NATURE* 413 (6857):732-8.
- ALTER, M. J. 2007. EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *WORLD J GASTROENTEROL* 13 (17):2436-41.
- ANTHONY, D. D., N. L. YONKERS, A. B. POST, R. ASAAD, F. P. HEINZEL, 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 (8):4907-16.
- ARRODE, G., C. BOCCACCIO, J. LULE, S. ALLART, N. MOINARD, J. P. ABASTADO, A. ALAM, AND C. DAVRINCHE. 2000. INCOMING HUMAN CYTOMEGALOVIRUS PP65 (UL83) CONTAINED IN APOPTOTIC INFECTED FIBROBLASTS IS CROSS-PRESENTED TO CD8(+) T CELLS BY DENDRITIC CELLS. *J VIROL* 74 (21):10018-24.
- 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 (10):3171-6.

- AVERILL, L., W. M. LEE, AND N. J. KARANDIKAR. 2007. DIFFERENTIAL DYSFUNCTION IN DENDRITIC CELL SUBSETS DURING CHRONIC HCV INFECTION. *CLIN IMMUNOL* 123 (1):40-9.
- 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 (2):512-24.
- BANAUDHA, K., J. M. ORENSTEIN, T. KOROLNEK, G. C. ST LAURENT, 3RD, T. WAKITA, AND A. KUMAR. 2010. PRIMARY HEPATOCYTE CULTURE SUPPORTS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION: A MODEL FOR INFECTION-ASSOCIATED HEPATOCARCINOGENESIS. *HEPATOLOGY* 51 (6):1922-32.
- BANCHEREAU, J., F. BRIERE, C. CAUX, J. DAVOUST, S. LEBECQUE, Y. J. LIU, B. PULENDRAN, AND K. PALUCKA. 2000. IMMUNOBIOLOGY OF DENDRITIC CELLS. *ANNU REV IMMUNOL* 18:767-811.
- BANTEL, H., A. LUGERING, C. POREMBA, N. LUGERING, J. HELD, W. DOMSCHKE, AND K. SCHULZE-OSTHOFF. 2001. CASPASE ACTIVATION CORRELATES WITH THE DEGREE OF INFLAMMATORY LIVER INJURY IN CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *HEPATOLOGY* 34 (4 Pt 1):758-67.
- BARTENSCHLAGER, R., M. FRESE, AND T. PIETSCHMANN. 2004. NOVEL INSIGHTS INTO HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND PERSISTENCE. *ADV VIRUS RES* 63:71-180.
- BARTENSCHLAGER, R., AND V. LOHMANN. 2000. REPLICATION OF HEPATITIS C VIRUS. *J GEN VIROL* 81 (Pt 7):1631-48.
- BARTENSCHLAGER, R., AND V. LOHMANN. 2001. NOVEL CELL CULTURE SYSTEMS FOR THE HEPATITIS C VIRUS. *ANTIVIRAL RES* 52 (1):1-17.
- BARTENSCHLAGER, R., AND T. PIETSCHMANN. 2005. EFFICIENT HEPATITIS C VIRUS CELL CULTURE SYSTEM: WHAT A DIFFERENCE THE HOST CELL MAKES. *PROC NATL ACAD SCI USA* 102 (28):9739-40.
- BARTH, H., C. SCHAFFER, M. I. ADAH, F. ZHANG, R. J. LINHARDT, H. TOYODA, A. KINOSHITA-TOYODA, T. TOIDA, T. H. VAN KUPPEVELT, E. DEPLA, F. VON WEIZSACKER, H. E. BLUM, AND T. F. BAUMERT. 2003. CELLULAR BINDING OF HEPATITIS C VIRUS ENVELOPE GLYCOPROTEIN E2 REQUIRES CELL SURFACE HEPARAN SULFATE. *J BIOL CHEM* 278 (42):41003-12.
- BENNETT, S. R., F. R. CARBONE, F. KARAMALIS, R. A. FLAVELL, J. F. MILLER, AND W. R. HEATH. 1998. HELP FOR CYTOTOXIC-T-CELL RESPONSES IS MEDIATED BY CD40 SIGNALING. *NATURE* 393 (6684):478-80.
- BERTOLINO, P., G. KLIMPEL, AND S. M. LEMON. 2000. HEPATIC INFLAMMATION AND IMMUNITY: A SUMMARY OF A CONFERENCE ON THE FUNCTION OF THE IMMUNE SYSTEM WITHIN THE LIVER. *HEPATOLOGY* 31 (6):1374-8.

- BEVAN, M. J., R. E. LANGMAN, AND M. COHN. 1976. H-2 ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC T CELLS INDUCED BY CONCAVALIN A: ESTIMATION OF THEIR RELATIVE FREQUENCY. *EUR J IMMUNOL* 6 (3):150-6.
- BIEBACK, K., E. LIEN, I. M. KLAGGE, E. AVOTA, J. SCHNEIDER-SCHAULIES, W. P. DUPREX, H. WAGNER, C. J. KIRSCHNING, V. TER MEULEN, AND S. SCHNEIDER-SCHAULIES. 2002. HEMAGGLUTININ PROTEIN OF WILD-TYPE MEASLES VIRUS ACTIVATES TOLL-LIKE RECEPTOR 2 SIGNALING. *J VIROL* 76 (17):8729-36.
- 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 (24):13779-92.
- BLANKENSTEIN, T., AND T. SCHULER. 2002. CROSS-PRIMING VERSUS CROSS-TOLERANCE: ARE TWO SIGNALS ENOUGH? *TRENDS IMMUNOL* 23 (4):171-3.
- BLIGHT, K. J., J. A. MCKEATING, AND C. M. RICE. 2002. HIGHLY PERMISSIVE CELL LINES FOR SUBGENOMIC AND GENOMIC HEPATITIS C VIRUS RNA REPLICATION. *J VIROL* 76 (24):13001-14.
- BODE, J. G., S. LUDWIG, C. EHRHARDT, U. ALBRECHT, A. ERHARDT, F. SCHAPER, P. C. HEINRICH, AND D. HAUSSINGER. 2003. IFN-ALPHA ANTAGONISTIC ACTIVITY OF HCV CORE PROTEIN INVOLVES INDUCTION OF SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALING-3. *FASEB J* 17 (3):488-90.
- BOISVERT, J., X. S. HE, R. CHEUNG, E. B. KEEFFE, T. WRIGHT, AND H. B. GREENBERG. 2001. QUANTITATIVE ANALYSIS OF HEPATITIS C VIRUS IN PERIPHERAL BLOOD AND LIVER: REPLICATION DETECTED ONLY IN LIVER. *J INFECT DIS* 184 (7):827-35.
- BOWEN, D. G., AND C. M. WALKER. 2005. ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES IN ACUTE AND CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *NATURE* 436 (7053):946-52.
- BRANCH, A. D., D. D. STUMP, J. A. GUTIERREZ, F. ENG, AND J. L. WALEWSKI. 2005. THE HEPATITIS C VIRUS ALTERNATE READING FRAME (ARF) AND ITS FAMILY OF NOVEL PRODUCTS: THE ALTERNATE READING FRAME PROTEIN/F-PROTEIN, THE DOUBLE-FRAMESHIFT PROTEIN, AND OTHERS. *SEMIN LIVER DIS* 25 (1):105-17.
- CALABRESE, F., P. PONTISSO, E. PETTENAZZO, L. BENVEGNU, A. VARIO, L. CHEMELLO, A. ALBERTI, AND M. VALENTE. 2000. LIVER CELL APOPTOSIS IN CHRONIC HEPATITIS C CORRELATES WITH HISTOLOGICAL BUT NOT BIOCHEMICAL ACTIVITY OR SERUM HCV-RNA LEVELS. *HEPATOLOGY* 31 (5):1153-9.
- CAUX, C., C. MASSACRIER, B. VANBERVLIET, B. DUBOIS, C. VAN KOOTEN, I. DURAND, AND J. BANCHEREAU. 1994. ACTIVATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS THROUGH CD40 CROSS-LINKING. *J EXP MED* 180 (4):1263-72.

- CAUX, C., B. VANBERVLIET, C. MASSACRIER, C. DEZUTTER-DAMBUYANT, B. DE SAINT-VIS, C. JACQUET, K. YONEDA, S. IMAMURA, D. SCHMITT, AND J. BANCHEREAU. 1996. CD34+ HEMATOPOIETIC PROGENITORS FROM HUMAN CORD BLOOD DIFFERENTIATE ALONG TWO INDEPENDENT DENDRITIC CELL PATHWAYS IN RESPONSE TO GM-CSF+TNF ALPHA. *J EXP MED* 184 (2):695-706.
- CELLA, M., D. JARROSSAY, F. FACCHETTI, O. ALEBARDI, H. NAKAJIMA, A. LANZAVECCHIA, AND M. COLONNA. 1999. PLASMACYTOID MONOCYTES MIGRATE TO INFLAMED LYMPH NODES AND PRODUCE LARGE AMOUNTS OF TYPE I INTERFERON. *NAT MED* 5 (8):919-23.
- CHOO, Q. L., G. KUO, A. J. WEINER, L. R. OVERBY, D. W. BRADLEY, AND M. HOUGHTON. 1989. ISOLATION OF A CDNA CLONE DERIVED FROM A BLOOD-BORNE NON-A, NON-B VIRAL HEPATITIS GENOME. *SCIENCE* 244 (4902):359-62.
- CLARK, R., AND T. KUPPER. 2005. OLD MEETS NEW: THE INTERACTION BETWEEN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY. *J INVEST DERMATOL* 125 (4):629-37.
- COCUCCI, E., G. RACCHETTI, AND J. MELDOLESI. 2009. SHEDDING MICROVESICLES: ARTEFACTS NO MORE. *TRENDS CELL BIOL* 19 (2):43-51.
- COMPTON, T., E. A. KURT-JONES, K. W. BOEHME, J. BELKO, E. LATZ, D. T. GOLENBOCK, AND R. W. FINBERG. 2003. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS ACTIVATES INFLAMMATORY CYTOKINE RESPONSES VIA CD14 AND TOLL-LIKE RECEPTOR 2. *J VIROL* 77 (8):4588-96.
- COOPER, S., A. L. ERICKSON, E. J. ADAMS, J. KANSOPON, A. J. WEINER, D. Y. CHIEN, M. HOUGHTON, P. PARHAM, AND C. M. WALKER. 1999. ANALYSIS OF A SUCCESSFUL IMMUNE RESPONSE AGAINST HEPATITIS C VIRUS. *IMMUNITY* 10 (4):439-49.
- CORMIER, E. G., R. J. DURSO, F. TSAMIS, L. BOUSSEMARY, C. MANIX, W. C. OLSON, J. P. GARDNER, AND T. DRAGIC. 2004. L-SIGN (CD209L) AND DC-SIGN (CD209) MEDIATE TRANSINFECTION OF LIVER CELLS BY HEPATITIS C VIRUS. *PROC NATL ACAD SCI USA* 101 (39):14067-72.
- CRESSWELL, P., N. BANGIA, T. DICK, AND G. DIEDRICH. 1999. THE NATURE OF THE MHC CLASS I PEPTIDE LOADING COMPLEX. *IMMUNOL REV* 172:21-8.
- DASH, S., A. B. HALIM, H. TSUJI, N. HIRAMATSU, AND M. A. GERBER. 1997. TRANSFECTION OF HEPG2 CELLS WITH INFECTIOUS HEPATITIS C VIRUS GENOME. *AM J PATHOL* 151 (2):363-73.
- DECALF, J., S. FERNANDES, R. LONGMAN, M. AHLLOULAY, F. AUDAT, F. LEFRERRE, C. M. RICE, S. POL, AND M. L. ALBERT. 2007. PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS INITIATE A COMPLEX CHEMOKINE AND CYTOKINE NETWORK AND ARE A VIABLE DRUG TARGET IN CHRONIC HCV PATIENTS. *J EXP MED* 204 (10):2423-37.

- DENG, L., T. ADACHI, K. KITAYAMA, Y. BUNGYOKU, S. KITAZAWA, S. ISHIDO, I. SHOJI, AND H. HOTTA. 2008. HEPATITIS C VIRUS INFECTION INDUCES APOPTOSIS THROUGH A BAX-TRIGGERED, MITOCHONDRION-MEDIATED, CASPASE 3-DEPENDENT PATHWAY. *J VIROL* 82 (21):10375-85.
- DIEBOLD, S. S., T. KAISHO, H. HEMMI, S. AKIRA, AND C. REIS E SOUSA. 2004. INNATE ANTIVIRAL RESPONSES BY MEANS OF TLR7-MEDIATED RECOGNITION OF SINGLE-STRANDED RNA. *SCIENCE* 303 (5663):1529-31.
- DISTLER, J. H., D. S. PISETSKY, L. C. HUBER, J. R. KALDEN, S. GAY, AND O. DISTLER. 2005. MICROPARTICLES AS REGULATORS OF INFLAMMATION: NOVEL PLAYERS OF CELLULAR CROSSTALK IN THE RHEUMATIC DISEASES. *ARTHRITIS RHEUM* 52 (11):3337-48.
- DOLGANIUC, A., S. CHANG, K. KODYS, P. MANDREKAR, G. BAKIS, M. CORMIER, AND G. SZABO. 2006. HEPATITIS C VIRUS (HCV) CORE PROTEIN-INDUCED, MONOCYTE-MEDIATED MECHANISMS OF REDUCED IFN-ALPHA AND PLASMACYTOID DENDRITIC CELL LOSS IN CHRONIC HCV INFECTION. *J IMMUNOL* 177 (10):6758-68.
- DONG, C., AND R. A. FLAVELL. 2000. CELL FATE DECISION: T-HELPER 1 AND 2 SUBSETS IN IMMUNE RESPONSES. *ARTHRITIS RES* 2 (3):179-188.
- DUSTIN, L. B., AND C. M. RICE. 2007. FLYING UNDER THE RADAR: THE IMMUNOBIOLOGY OF HEPATITIS C. *ANNU REV IMMUNOL* 25:71-99.
- EBIHARA, T., M. SHINGAI, M. MATSUMOTO, T. WAKITA, AND T. SEYA. 2008. HEPATITIS C VIRUS-INFECTED HEPATOCYTES EXTRINSICALLY MODULATE DENDRITIC CELL MATURATION TO ACTIVATE T CELLS AND NATURAL KILLER CELLS. *HEPATOLOGY* 48 (1):48-58.
- EJRNAES, M., C. M. FILIPPI, M. M. MARTINIC, E. M. LING, L. M. TOGHER, S. CROTTY, AND M. G. VON HERRATH. 2006. RESOLUTION OF A CHRONIC VIRAL INFECTION AFTER INTERLEUKIN-10 RECEPTOR BLOCKADE. *J EXP MED* 203 (11):2461-72.
- EKEN, C., O. GASSER, G. ZENHAEUSERN, I. OEHRI, C. HESS, AND J. A. SCHIFFERLI. 2008. POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHIL-DERIVED ECTOSOMES INTERFERE WITH THE MATURATION OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS. *J IMMUNOL* 180 (2):817-24.
- ELLIOTT, M. R., F. B. CHEKENI, P. C. TRAMPONT, E. R. LAZAROWSKI, A. KADL, S. F. WALK, D. PARK, R. I. WOODSON, M. OSTANKOVICH, P. SHARMA, J. J. LYSIAK, T. K. HARDEN, N. LEITINGER, AND K. S. RAVICHANDRAN. 2009. NUCLEOTIDES RELEASED BY APOPTOTIC CELLS ACT AS A FIND-ME SIGNAL TO PROMOTE PHAGOCYTOTIC CLEARANCE. *NATURE* 461 (7261):282-6.
- ENGELMAYER, J., M. LARSSON, M. SUBKLEWE, A. CHAHROUDI, W. I. COX, R. M. STEINMAN, AND N. BHARDWAJ. 1999. VACCINIA VIRUS INHIBITS THE MATURATION

- OF HUMAN DENDRITIC CELLS: A NOVEL MECHANISM OF IMMUNE EVASION. *J IMMUNOL* 163 (12):6762-8.
- ENGERING, A. J., M. CELLA, D. FLUITSMA, M. BROCKHAUS, E. C. HOEFSMIT, A. LANZAVECCHIA, AND J. PIETERS. 1997. THE MANNOSE RECEPTOR FUNCTIONS AS A HIGH CAPACITY AND BROAD SPECIFICITY ANTIGEN RECEPTOR IN HUMAN DENDRITIC CELLS. *EUR J IMMUNOL* 27 (9):2417-25.
- EVANS, M. J., T. VON HAHN, D. M. TSCHERNE, A. J. SYDER, M. PANIS, B. WOLK, T. HATZIOANNOU, J. A. MCKEATING, P. D. BIENIASZ, AND C. M. RICE. 2007. CLAUDIN-1 IS A HEPATITIS C VIRUS CO-RECEPTOR REQUIRED FOR A LATE STEP IN ENTRY. *NATURE* 446 (7137):801-5.
- FAN, Z., X. L. HUANG, P. KALINSKI, S. YOUNG, AND C. R. RINALDO, JR. 2007. DENDRITIC CELL FUNCTION DURING CHRONIC HEPATITIS C VIRUS AND HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 INFECTION. *CLIN VACCINE IMMUNOL* 14 (9):1127-37.
- FANGER, N. A., K. WARDWELL, L. SHEN, T. F. TEDDER, AND P. M. GUYRE. 1996. TYPE I (CD64) AND TYPE II (CD32) FC GAMMA RECEPTOR-MEDIATED PHAGOCYTOSIS BY HUMAN BLOOD DENDRITIC CELLS. *J IMMUNOL* 157 (2):541-8.
- FEINSTONE, S. M., A. Z. KAPIKIAN, R. H. PURCELL, H. J. ALTER, AND P. V. HOLLAND. 1975. TRANSFUSION-ASSOCIATED HEPATITIS NOT DUE TO VIRAL HEPATITIS TYPE A OR B. *N ENGL J MED* 292 (15):767-70.
- FISCHER, R., T. BAUMERT, AND H. E. BLUM. 2007. HEPATITIS C VIRUS INFECTION AND APOPTOSIS. *WORLD J GASTROENTEROL* 13 (36):4865-72.
- FONTENEAU, J. F., D. G. KAVANAGH, M. LIRVALL, C. SANDERS, T. L. COVER, N. BHARDWAJ, AND M. LARSSON. 2003. CHARACTERIZATION OF THE MHC CLASS I CROSS-PRESENTATION PATHWAY FOR CELL-ASSOCIATED ANTIGENS BY HUMAN DENDRITIC CELLS. *BLOOD* 102 (13):4448-55.
- FOURNIER, C., C. SUREAU, J. COSTE, J. DUCOS, G. PAGEAUX, D. LARREY, J. DOMERGUE, AND P. MAUREL. 1998. IN VITRO INFECTION OF ADULT NORMAL HUMAN HEPATOCYTES IN PRIMARY CULTURE BY HEPATITIS C VIRUS. *J GEN VIROL* 79 ( PT 10):2367-74.
- FRIED, M. W., M. L. SHIFFMAN, K. R. REDDY, C. SMITH, G. MARINOS, F. L. GONCALES, JR., D. HAUSSINGER, M. DIAGO, G. CAROSI, D. DHUMEAUX, A. CRAXI, A. LIN, J. HOFFMAN, AND J. YU. 2002. PEGINTERFERON ALFA-2A PLUS RIBAVIRIN FOR CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *N ENGL J MED* 347 (13):975-82.
- GALE, M., JR., C. M. BLAKELY, B. KWIECISZEWSKI, S. L. TAN, M. DOSSETT, N. M. TANG, M. J. KORTH, S. J. POLYAK, D. R. GRETCH, AND M. G. KATZE. 1998. CONTROL OF PKR PROTEIN KINASE BY HEPATITIS C VIRUS NONSTRUCTURAL 5A PROTEIN: MOLECULAR MECHANISMS OF KINASE REGULATION. *MOL CELL BIOL* 18 (9):5208-18.

- GALE, M., JR., AND E. M. FOY. 2005. EVASION OF INTRACELLULAR HOST DEFENCE BY HEPATITIS C VIRUS. *NATURE* 436 (7053):939-45.
- GEISSMANN, F., P. LAUNAY, B. PASQUIER, Y. LEPELLETIER, M. LEBORGNE, A. LEHUE, N. BROUSSE, AND R. C. MONTEIRO. 2001. A SUBSET OF HUMAN DENDRITIC CELLS EXPRESSES IGA FC RECEPTOR (CD89), WHICH MEDIATES INTERNALIZATION AND ACTIVATION UPON CROSS-LINKING BY IGA COMPLEXES. *J IMMUNOL* 166 (1):346-52.
- GERLACH, J. T., H. M. DIEPOLDER, M. C. JUNG, N. H. GRUENER, W. W. SCHRAUT, R. ZACHOVAL, R. HOFFMANN, C. A. SCHIRREN, T. SANTANTONIO, AND G. R. PAPE. 1999. RECURRENCE OF HEPATITIS C VIRUS AFTER LOSS OF VIRUS-SPECIFIC CD4(+) T-CELL RESPONSE IN ACUTE HEPATITIS C. *GASTROENTEROLOGY* 117 (4):933-41.
- GLOBAL SURVEILLANCE AND CONTROL OF HEPATITIS C. REPORT OF A WHO CONSULTATION ORGANIZED IN COLLABORATION WITH THE VIRAL HEPATITIS PREVENTION BOARD, ANTWERP, BELGIUM. 1999. *J VIRAL HEPAT* 6 (1):35-47.
- GOGOLAK, P., B. RETHI, G. HAJAS, AND E. RAJNAVOLGYI. 2003. TARGETING DENDRITIC CELLS FOR PRIMING CELLULAR IMMUNE RESPONSES. *J MOL RECOGNIT* 16 (5):299-317.
- GOLDEN-MASON, L., B. PALMER, J. KLARQUIST, J. A. MENGSHOL, N. CASTELBLANCO, AND H. R. ROSEN. 2007. UPREGULATION OF PD-1 EXPRESSION ON CIRCULATING AND INTRAHEPATIC HEPATITIS C VIRUS-SPECIFIC CD8+ T CELLS ASSOCIATED WITH REVERSIBLE IMMUNE DYSFUNCTION. *J VIROL* 81 (17):9249-58.
- GONDOIS-REY, F., C. DENTAL, P. HALFON, T. F. BAUMERT, D. OLIVE, AND I. HIRSCH. 2009. HEPATITIS C VIRUS IS A WEAK INDUCER OF INTERFERON ALPHA IN PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS IN COMPARISON WITH INFLUENZA AND HUMAN HERPESVIRUS TYPE-1. *PLoS ONE* 4 (2):E4319.
- GOUTAGNY, N., A. FATMI, V. DE LEDINGHEN, F. PENIN, P. COUZIGOU, G. INCHAUSPE, AND C. BAIN. 2003. EVIDENCE OF VIRAL REPLICATION IN CIRCULATING DENDRITIC CELLS DURING HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *J INFECT DIS* 187 (12):1951-8.
- GUERMONPREZ, P., J. VALLADEAU, L. ZITVOGEL, C. THERY, AND S. AMIGORENA. 2002. ANTIGEN PRESENTATION AND T CELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS. *ANNU REV IMMUNOL* 20:621-67.
- GUEVIN, C., A. LAMARRE, AND P. LABONTE. 2009. NOVEL HCV REPLICATION MOUSE MODEL USING HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA XENOGRAFTS. *ANTIVIRAL RES* 84 (1):14-22.
- GUIDOTTI, L. G., AND F. V. CHISARI. 2001. NONCYTOLYTIC CONTROL OF VIRAL INFECTIONS BY THE INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE. *ANNU REV IMMUNOL* 19:65-91.
- GUNN, M. D., K. TANGEMANN, C. TAM, J. G. CYSTER, S. D. ROSEN, AND L. T. WILLIAMS. 1998. A CHEMOKINE EXPRESSED IN LYMPHOID HIGH ENDOTHELIAL VENULES

PROMOTES THE ADHESION AND CHEMOTAXIS OF NAIVE T LYMPHOCYTES. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 95 (1):258-63.

HEIL, F., H. HEMMI, H. HOCHREIN, F. AMPENBERGER, C. KIRSCHNING, S. AKIRA, G. LIPFORD, H. WAGNER, AND S. BAUER. 2004. SPECIES-SPECIFIC RECOGNITION OF SINGLE-STRANDED RNA VIA TOLL-LIKE RECEPTOR 7 AND 8. *SCIENCE* 303 (5663):1526-9.

HEMMI, H., O. TAKEUCHI, T. KAWAI, T. KAISHO, S. SATO, H. SANJO, M. MATSUMOTO, K. HOSHINO, H. WAGNER, K. TAKEDA, AND S. AKIRA. 2000. A TOLL-LIKE RECEPTOR RECOGNIZES BACTERIAL DNA. *NATURE* 408 (6813):740-5.

HIRANO, N., M. O. BUTLER, Z. XIA, S. ANSEN, M. S. VON BERGWELT-BAILDON, D. NEUBERG, G. J. FREEMAN, AND L. M. NADLER. 2006. ENGAGEMENT OF CD83 LIGAND INDUCES PROLONGED EXPANSION OF CD8+ T CELLS AND PREFERENTIAL ENRICHMENT FOR ANTIGEN SPECIFICITY. *BLOOD* 107 (4):1528-36.

IACOVACCI, S., M. SARGIACOMO, I. PAROLINI, A. PONZETTO, C. PESCHLE, AND G. CARLONI. 1993. REPLICATION AND MULTIPLICATION OF HEPATITIS C VIRUS GENOME IN HUMAN FOETAL LIVER CELLS. *RES VIROL* 144 (4):275-9.

INABA, K., S. TURLEY, F. YAMAIDE, T. IYODA, K. MAHNKE, M. INABA, M. PACK, M. SUBKLEWE, B. SAUTER, D. SHEFF, M. ALBERT, N. BHARDWAJ, I. MELLMAN, AND R. M. STEINMAN. 1998. EFFICIENT PRESENTATION OF PHAGOCYTOSED CELLULAR FRAGMENTS ON THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II PRODUCTS OF DENDRITIC CELLS. *J EXP MED* 188 (11):2163-73.

INOHARA, CHAMAILLARD, C. McDONALD, AND G. NUNEZ. 2005. NOD-LRR PROTEINS: ROLE IN HOST-MICROBIAL INTERACTIONS AND INFLAMMATORY DISEASE. *ANNU REV BIOCHEM* 74:355-83.

ISAACS, A., AND J. LINDENMANN. 1957. VIRUS INTERFERENCE. I. THE INTERFERON. *PROC R SOC LOND B BIOL SCI* 147 (927):258-67.

ITO, T., M. INABA, K. INABA, J. TOKI, S. SOGO, T. IGUCHI, Y. ADACHI, K. YAMAGUCHI, R. AMAKAWA, J. VALLADEAU, S. SAELAND, S. FUKUHARA, AND S. IKEHARA. 1999. A CD1A+/CD11c+ SUBSET OF HUMAN BLOOD DENDRITIC CELLS IS A DIRECT PRECURSOR OF LANGERHANS CELLS. *J IMMUNOL* 163 (3):1409-19.

ITO, T., J. MUKAIGAWA, J. ZUO, Y. HIRABAYASHI, K. MITAMURA, AND K. YASUI. 1996. CULTIVATION OF HEPATITIS C VIRUS IN PRIMARY HEPATOCYTE CULTURE FROM PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C RESULTS IN RELEASE OF HIGH TITRE INFECTIOUS VIRUS. *J GEN VIROL* 77 (Pt 5):1043-54.

JIANG, W., W. J. SWIGGARD, C. HEUFLER, M. PENG, A. MIRZA, R. M. STEINMAN, AND M. C. NUSSENZWEIG. 1995. THE RECEPTOR DEC-205 EXPRESSED BY DENDRITIC CELLS AND THYMIC EPITHELIAL CELLS IS INVOLVED IN ANTIGEN PROCESSING. *NATURE* 375 (6527):151-5.

- JONES, T. R., E. J. WIERTZ, L. SUN, K. N. FISH, J. A. NELSON, AND H. L. PLOEGH. 1996. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS US3 IMPAIRS TRANSPORT AND MATURATION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I HEAVY CHAINS. *PROC NATL ACAD SCI USA* 93 (21):11327-33.
- JONULEIT, H., E. SCHMITT, G. SCHULER, J. KNOP, AND A. H. ENK. 2000. INDUCTION OF INTERLEUKIN 10-PRODUCING, NONPROLIFERATING CD4(+) T CELLS WITH REGULATORY PROPERTIES BY REPETITIVE STIMULATION WITH ALLOGENEIC IMMATURE HUMAN DENDRITIC CELLS. *J EXP MED* 192 (9):1213-22.
- KAGI, D., F. VIGNAUX, B. LEDERMANN, K. BURKI, V. DEPRAETERE, S. NAGATA, H. HENGARTNER, AND P. GOLSTEIN. 1994. FAS AND PERFORIN PATHWAYS AS MAJOR MECHANISMS OF T CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY. *SCIENCE* 265 (5171):528-30.
- KAISERLIAN, D., AND B. DUBOIS. 2001. DENDRITIC CELLS AND VIRAL IMMUNITY: FRIENDS OR FOES? *SEMIN IMMUNOL* 13 (5):303-10.
- KANNEGANTI, T. D., M. BODY-MALAPEL, A. AMER, J. H. PARK, J. WHITFIELD, L. FRANCHI, Z. F. TARAPOREWALA, D. MILLER, J. T. PATTON, N. INOHARA, AND G. NUNEZ. 2006. CRITICAL ROLE FOR CRYOPYRIN/NALP3 IN ACTIVATION OF CASPASE-1 IN RESPONSE TO VIRAL INFECTION AND DOUBLE-STRANDED RNA. *J BIOL CHEM* 281 (48):36560-8.
- 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 (9):5584-91.
- KANTO, T., M. INOUE, H. MIYATAKE, A. SATO, M. SAKAKIBARA, T. YAKUSHIJIN, C. OKI, I. ITOSE, N. HIRAMATSU, T. TAKEHARA, A. KASAHARA, AND N. HAYASHI. 2004. REDUCED NUMBERS AND IMPAIRED ABILITY OF MYELOID AND PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS TO POLARIZE T HELPER CELLS IN CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *J INFECT DIS* 190 (11):1919-26.
- KAPSENBERG, M. L. 2003. DENDRITIC-CELL CONTROL OF PATHOGEN-DRIVEN T-CELL POLARIZATION. *NAT REV IMMUNOL* 3 (12):984-93.
- KARP, C. L. 1999. MEASLES: IMMUNOSUPPRESSION, INTERLEUKIN-12, AND COMPLEMENT RECEPTORS. *IMMUNOL REV* 168:91-101.
- KATO, T., T. DATE, M. MIYAMOTO, A. FURUSAKA, K. TOKUSHIGE, M. MIZOKAMI, AND T. WAKITA. 2003. EFFICIENT REPLICATION OF THE GENOTYPE 2A HEPATITIS C VIRUS SUBGENOMIC REPLICON. *GASTROENTEROLOGY* 125 (6):1808-17.
- KAWAI, T., AND S. AKIRA. 2006. INNATE IMMUNE RECOGNITION OF VIRAL INFECTION. *NAT IMMUNOL* 7 (2):131-7.

- KAWAI, T., AND S. AKIRA. 2009. THE ROLES OF TLRs, RLRs AND NLRs IN PATHOGEN RECOGNITION. *INT IMMUNOL* 21 (4):317-37.
- KOZIEL, M. J., D. DUDLEY, J. T. WONG, J. DIENSTAG, M. HOUGHTON, R. RALSTON, AND B. D. WALKER. 1992. INTRAHEPATIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES SPECIFIC FOR HEPATITIS C VIRUS IN PERSONS WITH CHRONIC HEPATITIS. *J IMMUNOL* 149 (10):3339-44.
- KROPSHOFER, H., G. J. HAMMERLING, AND A. B. VOGT. 1999. THE IMPACT OF THE NON-CLASSICAL MHC PROTEINS HLA-DM AND HLA-DO ON LOADING OF MHC CLASS II MOLECULES. *IMMUNOL REV* 172:267-78.
- KURT-JONES, E. A., M. CHAN, S. ZHOU, J. WANG, G. REED, R. BRONSON, M. M. ARNOLD, D. M. KNIPE, AND R. W. FINBERG. 2004. HERPES SIMPLEX VIRUS 1 INTERACTION WITH TOLL-LIKE RECEPTOR 2 CONTRIBUTES TO LETHAL ENCEPHALITIS. *PROC NATL ACAD SCI USA* 101 (5):1315-20.
- KURT-JONES, E. A., L. POPOVA, L. KWINN, L. M. HAYNES, L. P. JONES, R. A. TRIPP, E. E. WALSH, M. W. FREEMAN, D. T. GOLENBOCK, L. J. ANDERSON, AND R. W. FINBERG. 2000. PATTERN RECOGNITION RECEPTORS TLR4 AND CD14 MEDIATE RESPONSE TO RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS. *NAT IMMUNOL* 1 (5):398-401.
- LAN, L., S. GORKE, S. J. RAU, M. B. ZEISEL, E. HILDT, K. HIMMELSBACH, M. CARVAJAL-YEPES, R. HUBER, T. WAKITA, A. SCHMITT-GRAEFF, C. ROYER, H. E. BLUM, R. FISCHER, AND T. F. BAUMERT. 2008. HEPATITIS C VIRUS INFECTION SENSITIZES HUMAN HEPATOCYTES TO TRAIL-INDUCED APOPTOSIS IN A CASPASE 9-DEPENDENT MANNER. *J IMMUNOL* 181 (7):4926-35.
- LANFORD, R. E., C. SUREAU, J. R. JACOB, R. WHITE, AND T. R. FUERST. 1994. DEMONSTRATION OF IN VITRO INFECTION OF CHIMPANZEE HEPATOCYTES WITH HEPATITIS C VIRUS USING STRAND-SPECIFIC RT/PCR. *VIROLOGY* 202 (2):606-14.
- LARSSON, M., J. F. FONTENEAU, S. SOMERSAN, C. SANDERS, K. BICKHAM, E. K. THOMAS, K. MAHNKE, AND N. BHARDWAJ. 2001. EFFICIENCY OF CROSS PRESENTATION OF VACCINIA VIRUS-DERIVED ANTIGENS BY HUMAN DENDRITIC CELLS. *EUR J IMMUNOL* 31 (12):3432-42.
- LAUER, G. M., E. BARNES, M. LUCAS, J. TIMM, K. OUCHI, A. Y. KIM, C. L. DAY, G. K. ROBBINS, D. R. CASSON, M. REISER, G. DUSHEIKO, T. M. ALLEN, R. T. CHUNG, B. D. WALKER, AND P. KLENERMAN. 2004. HIGH RESOLUTION ANALYSIS OF CELLULAR IMMUNE RESPONSES IN RESOLVED AND PERSISTENT HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *GASTROENTEROLOGY* 127 (3):924-36.
- LAUER, G. M., AND B. D. WALKER. 2001. HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *N ENGL J MED* 345 (1):41-52.
- LECHNER, F., D. K. WONG, P. R. DUNBAR, R. CHAPMAN, R. T. CHUNG, P. DOHRENWEND, G. ROBBINS, R. PHILLIPS, P. KLENERMAN, AND B. D. WALKER. 2000. ANALYSIS OF

SUCCESSFUL IMMUNE RESPONSES IN PERSONS INFECTED WITH HEPATITIS C VIRUS. *J EXP MED* 191 (9):1499-512.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S., J. M. WALDBURGER, C. REIS E SOUSA, H. ACHA-ORBEA, AND W. REITH. 2004. MHC CLASS II EXPRESSION IS DIFFERENTIALLY REGULATED IN PLASMACYTOID AND CONVENTIONAL DENDRITIC CELLS. *NAT IMMUNOL* 5 (9):899-908.

LENSCHOW, D. J., T. L. WALUNAS, AND J. A. BLUESTONE. 1996. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *ANNU REV IMMUNOL* 14:233-58.

LI, K., E. FOY, J. C. FERREON, M. NAKAMURA, A. C. FERREON, M. IKEDA, S. C. RAY, M. GALE, JR., AND S. M. LEMON. 2005. IMMUNE EVASION BY HEPATITIS C VIRUS NS3/4A PROTEASE-MEDIATED CLEAVAGE OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 3 ADAPTOR PROTEIN TRIF. *PROC NATL ACAD SCI USA* 102 (8):2992-7.

LI, X. D., L. SUN, R. B. SETH, G. PINEDA, AND Z. J. CHEN. 2005. HEPATITIS C VIRUS PROTEASE NS3/4A CLEAVES MITOCHONDRIAL ANTIVIRAL SIGNALING PROTEIN OFF THE MITOCHONDRIA TO EVADE INNATE IMMUNITY. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 102 (49):17717-22.

LIANG, H., R. S. RUSSELL, N. L. YONKERS, D. McDONALD, B. RODRIGUEZ, C. V. HARDING, AND D. D. ANTHONY. 2009. DIFFERENTIAL EFFECTS OF HEPATITIS C VIRUS JFH1 ON HUMAN MYELOID AND PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS. *J VIROL* 83 (11):5693-707.

LIANG, T. J., B. REHERMANN, L. B. SEEFF, AND J. H. HOOFNAGLE. 2000. PATHOGENESIS, NATURAL HISTORY, TREATMENT, AND PREVENTION OF HEPATITIS C. *ANN INTERN MED* 132 (4):296-305.

LINDENBACH, B. D., M. J. EVANS, A. J. SYDER, B. WOLK, T. L. TELLINGHUISEN, C. C. LIU, T. MARUYAMA, R. O. HYNES, D. R. BURTON, J. A. McKEATING, AND C. M. RICE. 2005. COMPLETE REPLICATION OF HEPATITIS C VIRUS IN CELL CULTURE. *SCIENCE* 309 (5734):623-6.

LINDENBACH, B. D., AND C. M. RICE. 2005. UNRAVELLING HEPATITIS C VIRUS REPLICATION FROM GENOME TO FUNCTION. *NATURE* 436 (7053):933-8.

LOGVINOFF, C., M. E. MAJOR, D. OLDACH, S. HEYWARD, A. TALAL, P. BALFE, S. M. FEINSTONE, H. ALTER, C. M. RICE, AND J. A. McKEATING. 2004. NEUTRALIZING ANTIBODY RESPONSE DURING ACUTE AND CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *PROC NATL ACAD SCI USA* 101 (27):10149-54.

LOHMANN, V., S. HOFFMANN, U. HERIAN, F. PENIN, AND R. BARTENSCHLAGER. 2003. VIRAL AND CELLULAR DETERMINANTS OF HEPATITIS C VIRUS RNA REPLICATION IN CELL CULTURE. *J VIROL* 77 (5):3007-19.

- LOHMANN, V., F. KORNER, J. KOCH, U. HERIAN, L. THEILMANN, AND R. BARTENSLAGER. 1999. REPLICATION OF SUBGENOMIC HEPATITIS C VIRUS RNAs IN A HEPATOMA CELL LINE. *SCIENCE* 285 (5424):110-3.
- 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 (3):1026-9.
- LONGMAN, R. S., A. H. TALAL, I. M. JACOBSON, C. M. RICE, AND M. L. ALBERT. 2005. NORMAL FUNCTIONAL CAPACITY IN CIRCULATING MYELOID AND PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C. *J INFECT DIS* 192 (3):497-503.
- LOO, Y. M., D. M. OWEN, K. LI, A. K. ERICKSON, C. L. JOHNSON, P. M. FISH, D. S. CARNEY, T. WANG, H. ISHIDA, M. YONEYAMA, T. FUJITA, T. SAITO, W. M. LEE, C. H. HAGEDORN, D. T. LAU, S. A. WEINMAN, S. M. LEMON, AND M. GALE, JR. 2006. VIRAL AND THERAPEUTIC CONTROL OF IFN-BETA PROMOTER STIMULATOR 1 DURING HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 103 (15):6001-6.
- LUTZ, M. B., AND G. SCHULER. 2002. IMMATURE, SEMI-MATURE AND FULLY MATURE DENDRITIC CELLS: WHICH SIGNALS INDUCE TOLERANCE OR IMMUNITY? *TRENDS IMMUNOL* 23 (9):445-9.
- MACATONIA, S. E., N. A. HOSKEN, M. LITTON, P. VIEIRA, C. S. HSIEH, J. A. CULPEPPER, M. WYSOCKA, G. TRINCHIERI, K. M. MURPHY, AND A. O'GARRA. 1995. DENDRITIC CELLS PRODUCE IL-12 AND DIRECT THE DEVELOPMENT OF TH1 CELLS FROM NAIVE CD4+ T CELLS. *J IMMUNOL* 154 (10):5071-9.
- MAJOR, M. E., K. MIHALIK, M. PUIG, B. REHERMANN, M. NASCIMBENI, C. M. RICE, AND S. M. FEINSTONE. 2002. PREVIOUSLY INFECTED AND RECOVERED CHIMPANZEES EXHIBIT RAPID RESPONSES THAT CONTROL HEPATITIS C VIRUS REPLICATION UPON RECHALLENGE. *J VIROL* 76 (13):6586-95.
- MANNS, M. P., J. G. MCHUTCHISON, S. C. GORDON, V. K. RUSTGI, M. SHIFFMAN, R. REINDOLLAR, Z. D. GOODMAN, K. KOURY, M. LING, AND J. K. ALBRECHT. 2001. PEGINTERFERON ALFA-2B PLUS RIBAVIRIN COMPARED WITH INTERFERON ALFA-2B PLUS RIBAVIRIN FOR INITIAL TREATMENT OF CHRONIC HEPATITIS C: A RANDOMISED TRIAL. *LANCET* 358 (9286):958-65.
- MATEU, G., R. O. DONIS, T. WAKITA, J. BUKH, AND A. GRAKOU. 2008. INTRAGENOTYPIC JFH1 BASED RECOMBINANT HEPATITIS C VIRUS PRODUCES HIGH LEVELS OF INFECTIOUS PARTICLES BUT CAUSES INCREASED CELL DEATH. *VIROLOGY* 376 (2):397-407.
- McFADDEN, G., AND P. M. MURPHY. 2000. HOST-RELATED IMMUNOMODULATORS ENCODED BY POXVIRUSES AND HERPESVIRUSES. *CURR OPIN MICROBIOL* 3 (4):371-8.

- MEHTA, S. H., A. COX, D. R. HOOVER, X. H. WANG, Q. MAO, S. RAY, S. A. STRATHDEE, D. VLAHOV, AND D. L. THOMAS. 2002. PROTECTION AGAINST PERSISTENCE OF HEPATITIS C. *LANCET* 359 (9316):1478-83.
- MERCER, D. F., D. E. SCHILLER, J. F. ELLIOTT, D. N. DOUGLAS, C. HAO, A. RINFRET, W. R. ADDISON, K. P. FISCHER, T. A. CHURCHILL, J. R. LAKEY, D. L. TYRRELL, AND N. M. KNETEMAN. 2001. HEPATITIS C VIRUS REPLICATION IN MICE WITH CHIMERIC HUMAN LIVERS. *NAT MED* 7 (8):927-33.
- MEYLAN, E., J. CURRAN, K. HOFMANN, D. MORADPOUR, M. BINDER, R. BARTENSHLAGER, AND J. TSCHOPP. 2005. CARDIF IS AN ADAPTOR PROTEIN IN THE RIG-I ANTIVIRAL PATHWAY AND IS TARGETED BY HEPATITIS C VIRUS. *NATURE* 437 (7062):1167-72.
- MISSALE, G., R. BERTONI, V. LAMONACA, A. VALLI, M. MASSARI, C. MORI, M. G. RUMI, M. HOUGHTON, F. FIACCADORI, AND C. FERRARI. 1996. DIFFERENT CLINICAL BEHAVIORS OF ACUTE HEPATITIS C VIRUS INFECTION ARE ASSOCIATED WITH DIFFERENT VIGOR OF THE ANTI-VIRAL CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE. *J CLIN INVEST* 98 (3):706-14.
- MIYATAKE, H., T. KANTO, M. INOUE, M. SAKAKIBARA, A. KAIMORI, T. YAKUSHIJIN, I. ITOSE, M. MIYAZAKI, N. KUZUSHITA, N. HIRAMATSU, T. TAKEHARA, A. KASAHARA, AND N. HAYASHI. 2007. IMPAIRED ABILITY OF INTERFERON-ALPHA-PRIMED DENDRITIC CELLS TO STIMULATE TH1-TYPE CD4 T-CELL RESPONSE IN CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *J VIRAL HEPAT* 14 (6):404-12.
- NAKAMOTO, N., D. E. KAPLAN, J. COLECLOUGH, Y. LI, M. E. VALIGA, M. KAMINSKI, A. SHAKED, K. OLTHOFF, E. GOSTICK, D. A. PRICE, G. J. FREEMAN, E. J. WHERRY, AND K. M. CHANG. 2008. FUNCTIONAL RESTORATION OF HCV-SPECIFIC CD8 T CELLS BY PD-1 BLOCKADE IS DEFINED BY PD-1 EXPRESSION AND COMPARTMENTALIZATION. *GASTROENTEROLOGY* 134 (7):1927-37, 1937 e1-2.
- NIJMAN, H. W., M. J. KLEIJMEER, M. A. OSSEVOORT, V. M. OORSCHOT, M. P. VIERBOOM, M. VAN DE KEUR, P. KENEMANS, W. M. KAST, H. J. GEUZE, AND C. J. MELIEF. 1995. ANTIGEN CAPTURE AND MAJOR HISTOCOMPATIBILITY CLASS II COMPARTMENTS OF FRESHLY ISOLATED AND CULTURED HUMAN BLOOD DENDRITIC CELLS. *J EXP MED* 182 (1):163-74.
- OHSHIMA, Y., Y. TANAKA, H. TOZAWA, Y. TAKAHASHI, C. MALISZEWSKI, AND G. DELESPESE. 1997. EXPRESSION AND FUNCTION OF OX40 LIGAND ON HUMAN DENDRITIC CELLS. *J IMMUNOL* 159 (8):3838-48.
- OLWEUS, J., A. BITMANSOUR, R. WARNKE, P. A. THOMPSON, J. CARBALLIDO, L. J. PICKER, AND F. LUND-JOHANSEN. 1997. DENDRITIC CELL ONTOGENY: A HUMAN DENDRITIC CELL LINEAGE OF MYELOID ORIGIN. *PROC NATL ACAD SCI USA* 94 (23):12551-6.
- ORLAND, J. R., T. L. WRIGHT, AND S. COOPER. 2001. ACUTE HEPATITIS C. *HEPATOLOGY* 33 (2):321-7.

- PAMER, E., AND P. CRESSWELL. 1998. MECHANISMS OF MHC CLASS I--RESTRICTED ANTIGEN PROCESSING. *ANNU REV IMMUNOL* 16:323-58.
- PAP, E., E. PALLINGER, M. PASZTOI, AND A. FALUS. 2009. HIGHLIGHTS OF A NEW TYPE OF INTERCELLULAR COMMUNICATION: MICROVESICLE-BASED INFORMATION TRANSFER. *INFLAMM RES* 58 (1):1-8.
- PARDO, M., J. M. LOPEZ-ALCOROCHO, E. RODRIGUEZ-INIGO, I. CASTILLO, AND V. CARRENO. 2007. COMPARATIVE STUDY BETWEEN OCCULT HEPATITIS C VIRUS INFECTION AND CHRONIC HEPATITIS C. *J VIRAL HEPAT* 14 (1):36-40.
- PENIN, F., J. DUBUISSON, F. A. REY, D. MORADPOUR, AND J. M. PAWLOTSKY. 2004. STRUCTURAL BIOLOGY OF HEPATITIS C VIRUS. *HEPATOLOGY* 39 (1):5-19.
- PENNA, A., M. PILLI, A. ZERBINI, A. ORLANDINI, S. MEZZADRI, L. SACCHELLI, G. MISSALE, AND C. FERRARI. 2007. DYSFUNCTION AND FUNCTIONAL RESTORATION OF HCV-SPECIFIC CD8 RESPONSES IN CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *HEPATOLOGY* 45 (3):588-601.
- PEREZ, V. L., L. VAN PARIJS, A. BIUCKIANS, X. X. ZHENG, T. B. STROM, AND A. K. ABBAS. 1997. INDUCTION OF PERIPHERAL T CELL TOLERANCE IN VIVO REQUIRES CTLA-4 ENGAGEMENT. *IMMUNITY* 6 (4):411-7.
- PESTKA, J. M., M. B. ZEISEL, E. BLASER, P. SCHURMANN, B. BARTOSCH, F. L. COSSET, A. H. PATEL, H. MEISEL, J. BAUMERT, S. VIAZOV, K. RISPETER, H. E. BLUM, M. ROGGENDORF, AND T. F. BAUMERT. 2007. RAPID INDUCTION OF VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODIES AND VIRAL CLEARANCE IN A SINGLE-SOURCE OUTBREAK OF HEPATITIS C. *PROC NATL ACAD SCI USA* 104 (14):6025-30.
- PICCIOLI, D., S. TAVARINI, S. NUTI, P. COLOMBATTO, M. BRUNETTO, F. BONINO, P. CICCOROSSO, 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 (1):61-7.
- PIERRE, P., AND I. MELLMAN. 1998. DEVELOPMENTAL REGULATION OF INVARIANT CHAIN PROTEOLYSIS CONTROLS MHC CLASS II TRAFFICKING IN MOUSE DENDRITIC CELLS. *CELL* 93 (7):1135-45.
- PIETSCHMANN, T., A. KAUL, G. KOUTSOUDAKIS, A. SHAVINSKAYA, S. KALLIS, E. STEINMANN, K. ABID, F. NEGRO, M. DREUX, F. L. COSSET, AND R. BARTENSLAGER. 2006. CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS INTRAGENOTYPIC AND INTERGENOTYPIC HEPATITIS C VIRUS CHIMERAS. *PROC NATL ACAD SCI USA* 103 (19):7408-13.
- PILERI, P., Y. UEMATSU, S. CAMPAGNOLI, G. GALLI, F. FALUGI, R. PETRACCA, A. J. WEINER, M. HOUGHTON, D. ROSA, G. GRANDI, AND S. ABRIGNANI. 1998. BINDING OF HEPATITIS C VIRUS TO CD81. *SCIENCE* 282 (5390):938-41.

- PILZER, D., O. GASSER, O. MOSKOVICH, J. A. SCHIFFERLI, AND Z. FISHELSON. 2005. EMISSION OF MEMBRANE VESICLES: ROLES IN COMPLEMENT RESISTANCE, IMMUNITY AND CANCER. *SPRINGER SEMIN IMMUNOPATHOL* 27 (3):375-87.
- PLATT, N., R. P. DA SILVA, AND S. GORDON. 1998. RECOGNIZING DEATH: THE PHAGOCYTOSIS OF APOPTOTIC CELLS. *TRENDS CELL BIOL* 8 (9):365-72.
- PLOSS, A., M. J. EVANS, V. A. GAYSINSKAYA, M. PANIS, H. YOU, Y. P. DE JONG, AND C. M. RICE. 2009. HUMAN OCCLUDIN IS A HEPATITIS C VIRUS ENTRY FACTOR REQUIRED FOR INFECTION OF MOUSE CELLS. *NATURE* 457 (7231):882-6.
- PODEVIN, P., A. CARPENTIER, V. PENE, L. AOUJJEHANE, M. CARRIERE, S. ZAIDI, C. HERNANDEZ, V. CALLE, J. F. MERITET, O. SCATTON, M. DREUX, F. L. COSSET, T. WAKITA, R. BARTENSLAGER, S. DEMIGNOT, F. CONTI, A. R. ROSENBERG, AND Y. CALMUS. 2010. PRODUCTION OF INFECTIOUS HEPATITIS C VIRUS IN PRIMARY CULTURES OF HUMAN ADULT HEPATOCYTES. *GASTROENTEROLOGY*.
- POST, J. J., Y. PAN, A. J. FREEMAN, C. E. HARVEY, P. A. WHITE, P. PALLADINETTI, P. S. HABER, G. MARINOS, M. H. LEVY, J. M. KALDOR, K. A. DOLAN, R. A. FFRENCH, A. R. LLOYD, AND W. D. RAWLINSON. 2004. CLEARANCE OF HEPATITIS C VIREMIA ASSOCIATED WITH CELLULAR IMMUNITY IN THE ABSENCE OF SEROCONVERSION IN THE HEPATITIS C INCIDENCE AND TRANSMISSION IN PRISONS STUDY COHORT. *J INFECT DIS* 189 (10):1846-55.
- RADZIEWICZ, H., C. C. IBEGBU, M. L. FERNANDEZ, K. A. WORKOWSKI, K. OBIDEEN, M. WEHBI, H. L. HANSON, J. P. STEINBERG, D. MASOPUST, E. J. WHERRY, J. D. ALTMAN, B. T. ROUSE, G. J. FREEMAN, R. AHMED, AND A. GRAKOU. 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 (6):2545-53.
- RATAJCZAK, J., M. WYSOCZYNSKI, F. HAYEK, A. JANOWSKA-WIECZOREK, AND M. Z. RATAJCZAK. 2006. MEMBRANE-DERIVED MICROVESICLES: IMPORTANT AND UNDERAPPRECIATED MEDIATORS OF CELL-TO-CELL COMMUNICATION. *LEUKEMIA* 20 (9):1487-95.
- REHERMANN, B., K. M. CHANG, J. G. MCHUTCHISON, R. KOKKA, M. HOUGHTON, AND F. V. CHISARI. 1996. QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE PERIPHERAL BLOOD CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE RESPONSE IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *J CLIN INVEST* 98 (6):1432-40.
- REIS E SOUSA, C. 2006. DENDRITIC CELLS IN A MATURE AGE. *NAT REV IMMUNOL* 6 (6):476-83.
- REIS E SOUSA, C., P. D. STAHL, AND J. M. AUSTYN. 1993. PHAGOCYTOSIS OF ANTIGENS BY LANGERHANS CELLS IN VITRO. *J EXP MED* 178 (2):509-19.

- RESCIGNO, M., V. PIGUET, B. VALZASINA, S. LENS, R. ZUBLER, L. FRENCH, V. KINDLER, J. TSCHOPP, AND P. RICCIARDI-CASTAGNOLI. 2000. FAS ENGAGEMENT INDUCES THE MATURATION OF DENDRITIC CELLS (DCs), THE RELEASE OF INTERLEUKIN (IL)-1BETA, AND THE PRODUCTION OF INTERFERON GAMMA IN THE ABSENCE OF IL-12 DURING DC-T CELL COGNATE INTERACTION: A NEW ROLE FOR FAS LIGAND IN INFLAMMATORY RESPONSES. *J EXP MED* 192 (11):1661-8.
- ROBERTS, R. M., L. LIU, AND A. ALEXENKO. 1997. NEW AND ATYPICAL FAMILIES OF TYPE I INTERFERONS IN MAMMALS: COMPARATIVE FUNCTIONS, STRUCTURES, AND EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS. *PROG NUCLEIC ACID RES MOL BIOL* 56:287-325.
- ROBERTSON, B., G. MYERS, C. HOWARD, T. BRETTIN, J. BUKH, B. GASCHEN, T. GOJOBORI, G. MAERTENS, M. MIZOKAMI, O. NAINAN, S. NETESOV, K. NISHIOKA, T. SHIN I, P. SIMMONDS, D. SMITH, L. STUYVER, AND A. WEINER. 1998. CLASSIFICATION, NOMENCLATURE, AND DATABASE DEVELOPMENT FOR HEPATITIS C VIRUS (HCV) AND RELATED VIRUSES: PROPOSALS FOR STANDARDIZATION. INTERNATIONAL COMMITTEE ON VIRUS TAXONOMY. *ARCH VIROL* 143 (12):2493-503.
- RODRIGUE-GERVAIS, I. G., L. JOUAN, G. BEAULE, 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 (11):5537-46.
- ROMANI, N., S. GRUNER, D. BRANG, E. KAMPGEN, A. LENZ, B. TROCKENBACHER, G. KONWALINKA, P. O. FRITSCH, R. M. STEINMAN, AND G. SCHULER. 1994. PROLIFERATING DENDRITIC CELL PROGENITORS IN HUMAN BLOOD. *J EXP MED* 180 (1):83-93.
- ROMANI, N., S. KOIDE, M. CROWLEY, M. WITMER-PACK, A. M. LIVINGSTONE, C. G. FATHMAN, K. INABA, AND R. M. STEINMAN. 1989. PRESENTATION OF EXOGENOUS PROTEIN ANTIGENS BY DENDRITIC CELLS TO T CELL CLONES. INTACT PROTEIN IS PRESENTED BEST BY IMMATURE, EPIDERMAL LANGERHANS CELLS. *J EXP MED* 169 (3):1169-78.
- ROVERE, P., C. VALLINOTO, A. BONDANZA, M. C. CROSTI, M. RESCIGNO, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, C. RUGARLI, AND A. A. MANFREDI. 1998. BYSTANDER APOPTOSIS TRIGGERS DENDRITIC CELL MATURATION AND ANTIGEN-PRESENTING FUNCTION. *J IMMUNOL* 161 (9):4467-71.
- RUBARTELLI, A., A. POGGI, AND M. R. ZOCCHI. 1997. THE SELECTIVE ENGULFMENT OF APOPTOTIC BODIES BY DENDRITIC CELLS IS MEDIATED BY THE ALPHA(V)BETA3 INTEGRIN AND REQUIRES INTRACELLULAR AND EXTRACELLULAR CALCIUM. *EUR J IMMUNOL* 27 (8):1893-900.
- RUMIN, S., P. BERTHILLON, E. TANAKA, K. KIYOSAWA, M. A. TRABAUD, T. BIZOLLON, C. GOULLAT, P. GRIPON, C. GUGUEN-GUILLOUZO, G. INCHAUSPE, AND C. TREPO. 1999. DYNAMIC ANALYSIS OF HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND QUASISPECIES

SELECTION IN LONG-TERM CULTURES OF ADULT HUMAN HEPATOCYTES INFECTED IN VITRO. *J GEN VIROL* 80 ( Pt 11):3007-18.

RUTEBEMBERWA, A., S. C. RAY, J. ASTEMBORSKI, J. LEVINE, L. LIU, K. A. DOWD, S. CLUTE, C. WANG, A. KORMAN, A. SETTE, J. SIDNEY, D. M. PARDOLL, AND A. L. COX. 2008. HIGH-PROGRAMMED DEATH-1 LEVELS ON HEPATITIS C VIRUS-SPECIFIC T CELLS DURING ACUTE INFECTION ARE ASSOCIATED WITH VIRAL PERSISTENCE AND REQUIRE PRESERVATION OF COGNATE ANTIGEN DURING CHRONIC INFECTION. *J IMMUNOL* 181 (12):8215-25.

SAITO, K., M. AIT-GOUGHOLTE, S. M. TRUSCOTT, K. MEYER, A. BLAZEVIC, G. ABATE, R. B. RAY, D. F. HOFT, AND R. RAY. 2008. HEPATITIS C VIRUS INHIBITS CELL SURFACE EXPRESSION OF HLA-DR, PREVENTS DENDRITIC CELL MATURATION, AND INDUCES INTERLEUKIN-10 PRODUCTION. *J VIROL* 82 (7):3320-8.

SALLUSTO, F., P. SCHAERLI, P. LOETSCHER, C. SCHANIEL, D. LENIG, C. R. MACKAY, S. QIN, AND A. LANZAVECCHIA. 1998. RAPID AND COORDINATED SWITCH IN CHEMOKINE RECEPTOR EXPRESSION DURING DENDRITIC CELL MATURATION. *EUR J IMMUNOL* 28 (9):2760-9.

SAUTER, B., M. L. ALBERT, L. FRANCISCO, M. LARSSON, S. SOMERSAN, AND N. BHARDWAJ. 2000. CONSEQUENCES OF CELL DEATH: EXPOSURE TO NECROTIC TUMOR CELLS, BUT NOT PRIMARY TISSUE CELLS OR APOPTOTIC CELLS, INDUCES THE MATURATION OF IMMUNOSTIMULATORY DENDRITIC CELLS. *J EXP MED* 191 (3):423-34.

SCARSELLI, E., H. ANSUINI, R. CERINO, R. M. ROCCASECCA, S. ACALI, G. FILOCAMO, C. TRABONI, A. NICOSIA, R. CORTESE, AND A. VITELLI. 2002. THE HUMAN SCAVENGER RECEPTOR CLASS B TYPE I IS A NOVEL CANDIDATE RECEPTOR FOR THE HEPATITIS C VIRUS. *EMBO J* 21 (19):5017-25.

SCHULER, G., AND R. M. STEINMAN. 1985. MURINE EPIDERMAL LANGERHANS CELLS MATURE INTO POTENT IMMUNOSTIMULATORY DENDRITIC CELLS IN VITRO. *J EXP MED* 161 (3):526-46.

SEKINE-OSAJIMA, Y., N. SAKAMOTO, K. MISHIMA, M. NAKAGAWA, Y. ITSUI, M. TASAKA, Y. NISHIMURA-SAKURAI, C. H. CHEN, T. KANAI, K. TSUCHIYA, T. WAKITA, N. ENOMOTO, AND M. WATANABE. 2008. DEVELOPMENT OF PLAQUE ASSAYS FOR HEPATITIS C VIRUS-JFH1 STRAIN AND ISOLATION OF MUTANTS WITH ENHANCED CYTOPATHOGENICITY AND REPLICATION CAPACITY. *VIROLOGY* 371 (1):71-85.

SHEPARD, C. W., L. FINELLI, AND M. J. ALTER. 2005. GLOBAL EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *LANCET INFECT DIS* 5 (9):558-67.

SHEVACH, E. M., AND A. S. ROSENTHAL. 1973. FUNCTION OF MACROPHAGES IN ANTIGEN RECOGNITION BY GUINEA PIG T LYMPHOCYTES. II. ROLE OF THE MACROPHAGE IN THE REGULATION OF GENETIC CONTROL OF THE IMMUNE RESPONSE. *J EXP MED* 138 (5):1213-29.

- SHIINA, M., AND B. REHERMANN. 2008. CELL CULTURE-PRODUCED HEPATITIS C VIRUS IMPAIRS PLASMACYTOID DENDRITIC CELL FUNCTION. *HEPATOLOGY* 47 (2):385-95.
- SHORTMAN, K., AND Y. J. LIU. 2002. MOUSE AND HUMAN DENDRITIC CELL SUBTYPES. *NAT REV IMMUNOL* 2 (3):151-61.
- SHOUKRY, N. H., A. GRAKOU, M. HOUGHTON, D. Y. CHIEN, J. GHAYEB, K. A. REIMANN, AND C. M. WALKER. 2003. MEMORY CD8<sup>+</sup> T CELLS ARE REQUIRED FOR PROTECTION FROM PERSISTENT HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *J EXP MED* 197 (12):1645-55.
- SIMMONDS, P., J. BUKH, C. COMBET, G. DELEAGE, N. ENOMOTO, S. FEINSTONE, P. HALFON, G. INCHAUSPE, C. KUIKEN, G. MAERTENS, M. MIZOKAMI, D. G. MURPHY, H. OKAMOTO, J. M. PAWLITSKY, F. PENIN, E. SABLON, I. T. SHIN, L. J. STUYVER, H. J. THIEL, S. VIAZOV, A. J. WEINER, AND A. WIDELL. 2005. CONSENSUS PROPOSALS FOR A UNIFIED SYSTEM OF NOMENCLATURE OF HEPATITIS C VIRUS GENOTYPES. *HEPATOLOGY* 42 (4):962-73.
- SPRIGGS, M. K. 1996. ONE STEP AHEAD OF THE GAME: VIRAL IMMUNOMODULATORY MOLECULES. *ANNU REV IMMUNOL* 14:101-30.
- STARK, G. R., I. M. KERR, B. R. WILLIAMS, R. H. SILVERMAN, AND R. D. SCHREIBER. 1998. HOW CELLS RESPOND TO INTERFERONS. *ANNU REV BIOCHEM* 67:227-64.
- STEINMAN, R. M., AND M. D. WITMER. 1978. LYMPHOID DENDRITIC CELLS ARE POTENT STIMULATORS OF THE PRIMARY MIXED LEUKOCYTE REACTION IN MICE. *PROC NATL ACAD SCI USA* 75 (10):5132-6.
- STEINMANN, D., H. BARTH, B. GISSLER, P. SCHURMANN, M. I. ADAH, J. T. GERLACH, G. R. PAPE, E. DEPLA, D. JACOBS, G. MAERTENS, A. H. PATEL, G. INCHAUSPE, T. J. LIANG, H. E. BLUM, AND T. F. BAUMERT. 2004. INHIBITION OF HEPATITIS C VIRUS-LIKE PARTICLE BINDING TO TARGET CELLS BY ANTIVIRAL ANTIBODIES IN ACUTE AND CHRONIC HEPATITIS C. *J VIROL* 78 (17):9030-40.
- STUART, L. M., M. LUCAS, C. SIMPSON, J. LAMB, J. SAVILL, AND A. LACY-HULBERT. 2002. INHIBITORY EFFECTS OF APOPTOTIC CELL INGESTION UPON ENDOTOXIN-DRIVEN MYELOID DENDRITIC CELL MATURATION. *J IMMUNOL* 168 (4):1627-35.
- SUMPTER, R., JR., Y. M. LOO, E. FOY, K. LI, M. YONEYAMA, T. FUJITA, S. M. LEMON, AND M. GALE, JR. 2005. REGULATING INTRACELLULAR ANTIVIRAL DEFENSE AND PERMISSIVENESS TO HEPATITIS C VIRUS RNA REPLICATION THROUGH A CELLULAR RNA HELICASE, RIG-I. *J VIROL* 79 (5):2689-99.
- SWAIN, S. L., A. D. WEINBERG, M. ENGLISH, AND G. HUSTON. 1990. IL-4 DIRECTS THE DEVELOPMENT OF TH2-LIKE HELPER EFFECTORS. *J IMMUNOL* 145 (11):3796-806.
- TAGUCHI, T., M. NAGANO-FUJII, M. AKUTSU, H. KADOYA, S. OHGIMOTO, S. ISHIDO, AND H. HOTTA. 2004. HEPATITIS C VIRUS NS5A PROTEIN INTERACTS WITH 2',5'-

- OLIGOADENYLATE SYNTHETASE AND INHIBITS ANTIVIRAL ACTIVITY OF IFN IN AN IFN SENSITIVITY-DETERMINING REGION-INDEPENDENT MANNER. *J GEN VIROL* 85 (Pt 4):959-69.
- TAKAKI, A., M. WIESE, G. MAERTENS, E. DEPLA, U. SEIFERT, A. LIEBETRAU, J. L. MILLER, M. P. MANNS, AND B. REHERMANN. 2000. CELLULAR IMMUNE RESPONSES PERSIST AND HUMORAL RESPONSES DECREASE TWO DECADES AFTER RECOVERY FROM A SINGLE-SOURCE OUTBREAK OF HEPATITIS C. *NAT MED* 6 (5):578-82.
- TAKEUCHI, O., AND S. AKIRA. 2007. RECOGNITION OF VIRUSES BY INNATE IMMUNITY. *IMMUNOL REV* 220:214-24.
- TAKEUCHI, O., AND S. AKIRA. 2009. INNATE IMMUNITY TO VIRUS INFECTION. *IMMUNOL REV* 227 (1):75-86.
- TAYLOR, D. R., S. T. SHI, P. R. ROMANO, G. N. BARBER, AND M. M. LAI. 1999. INHIBITION OF THE INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN KINASE PKR BY HCV E2 PROTEIN. *SCIENCE* 285 (5424):107-10.
- THEOFILOPOULOS, A. N., R. BACCALA, B. BEUTLER, AND D. H. KONO. 2005. TYPE I INTERFERONS (ALPHA/BETA) IN IMMUNITY AND AUTOIMMUNITY. *ANNU REV IMMUNOL* 23:307-36.
- THERY, C., L. ZITVOGEL, AND S. AMIGORENA. 2002. EXOSOMES: COMPOSITION, BIOGENESIS AND FUNCTION. *NAT REV IMMUNOL* 2 (8):569-79.
- 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 USA* 99 (24):15661-8.
- THIMME, R., V. LOHMANN, AND F. WEBER. 2006. A TARGET ON THE MOVE: INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE ESCAPE STRATEGIES OF HEPATITIS C VIRUS. *ANTIVIRAL RES* 69 (3):129-41.
- THIMME, R., D. OLDACH, K. M. CHANG, C. STEIGER, S. C. RAY, AND F. V. CHISARI. 2001. DETERMINANTS OF VIRAL CLEARANCE AND PERSISTENCE DURING ACUTE HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *J EXP MED* 194 (10):1395-406.
- TORTORELLA, D., B. E. GEWURZ, M. H. FURMAN, D. J. SCHUST, AND H. L. PLOEGH. 2000. VIRAL SUBVERSION OF THE IMMUNE SYSTEM. *ANNU REV IMMUNOL* 18:861-926.
- TSUBOUCHI, E., S. M. AKBAR, N. HORIIKE, AND M. ONJI. 2004. INFECTION AND DYSFUNCTION OF CIRCULATING BLOOD DENDRITIC CELLS AND THEIR SUBSETS IN CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *J GASTROENTEROL* 39 (8):754-62.
- UEMATSU, S., AND S. AKIRA. 2007. TOLL-LIKE RECEPTORS AND TYPE I INTERFERONS. *J BIOL CHEM* 282 (21):15319-23.

- URBAN, B. C., N. WILLCOX, AND D. J. ROBERTS. 2001. A ROLE FOR CD36 IN THE REGULATION OF DENDRITIC CELL FUNCTION. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 98 (15):8750-5.
- VALENTI, R., V. HUBER, M. IERO, P. FILIPAZZI, G. PARMIANI, AND L. RIVOLTINI. 2007. TUMOR-RELEASED MICROVESICLES AS VEHICLES OF IMMUNOSUPPRESSION. *CANCER RES* 67 (7):2912-5.
- VANDENBORRE, K., S. W. VAN GOOL, A. KASRAN, J. L. CEUPPENS, M. A. BOOGAERTS, AND P. VANDENBERGHE. 1999. INTERACTION OF CTLA-4 (CD152) WITH CD80 OR CD86 INHIBITS HUMAN T-CELL ACTIVATION. *IMMUNOLOGY* 98 (3):413-21.
- VILLADANGOS, J. A., R. A. BRYANT, J. DEUSSING, C. DRIESSEN, A. M. LENNON-DUMENIL, R. J. RIESE, W. ROTH, P. SAFTIG, G. P. SHI, H. A. CHAPMAN, C. PETERS, AND H. L. PLOEGH. 1999. PROTEASES INVOLVED IN MHC CLASS II ANTIGEN PRESENTATION. *IMMUNOL REV* 172:109-20.
- VONA, G., R. TUVERI, O. DELPUECH, A. VALLET, D. CANIONI, G. BALLARDINI, J. BAPTISTE TRABUT, B. LE BAIL, B. NALPAS, F. CARNOT, S. POL, C. BRECHOT, AND V. THIERS. 2004. INTRAHEPATIC HEPATITIS C VIRUS RNA QUANTIFICATION IN MICRODISSECTED HEPATOCYTES. *J HEPATOL* 40 (4):682-8.
- VYAS, J., A. ELIA, AND M. J. CLEMENS. 2003. INHIBITION OF THE PROTEIN KINASE PKR BY THE INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE OF HEPATITIS C VIRUS GENOMIC RNA. *RNA* 9 (7):858-70.
- WAKITA, T., T. PIETSCHMANN, T. KATO, T. DATE, M. MIYAMOTO, Z. ZHAO, K. MURTHY, A. HABERMANN, H. G. KRAUSSLICH, M. MIZOKAMI, R. BARTENSLAGER, AND T. J. LIANG. 2005. PRODUCTION OF INFECTIOUS HEPATITIS C VIRUS IN TISSUE CULTURE FROM A CLONED VIRAL GENOME. *NAT MED* 11 (7):791-6.
- WALTERS, K. A., A. J. SYDER, S. L. LEDERER, D. L. DIAMOND, B. PAEPER, C. M. RICE, AND M. G. KATZE. 2009. GENOMIC ANALYSIS REVEALS A POTENTIAL ROLE FOR CELL CYCLE PERTURBATION IN HCV-MEDIATED APOPTOSIS OF CULTURED HEPATOCYTES. *PLoS PATHOG* 5 (1):E1000269.
- WEDEMAYER, 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 (6):3447-58.
- 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 (2):335-45.
- WONG, D. K., D. D. DUDLEY, N. H. AFDHAL, J. DIENSTAG, C. M. RICE, L. WANG, M. HOUGHTON, B. D. WALKER, AND M. J. KOZIEL. 1998. LIVER-DERIVED CTL IN

HEPATITIS C VIRUS INFECTION: BREADTH AND SPECIFICITY OF RESPONSES IN A COHORT OF PERSONS WITH CHRONIC INFECTION. *J IMMUNOL* 160 (3):1479-88.

YONKERS, N. L., B. RODRIGUEZ, K. A. MILKOVICH, R. ASAAD, M. M. LEDERMAN, P. S. HEEGER, AND D. D. ANTHONY. 2007. TLR LIGAND-DEPENDENT ACTIVATION OF NAIVE CD4 T CELLS BY PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS IS IMPAIRED IN HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *J IMMUNOL* 178 (7):4436-44.

YOO, B. J., M. J. SELBY, J. CHOE, B. S. SUH, S. H. CHOI, J. S. JOH, G. J. NUOVO, H. S. LEE, M. HOUGHTON, AND J. H. HAN. 1995. TRANSFECTION OF A DIFFERENTIATED HUMAN HEPATOMA CELL LINE (HUH7) WITH IN VITRO-TRANSCRIBED HEPATITIS C VIRUS (HCV) RNA AND ESTABLISHMENT OF A LONG-TERM CULTURE PERSISTENTLY INFECTED WITH HCV. *J VIROL* 69 (1):32-8.

YORK, I. A., C. ROOP, D. W. ANDREWS, S. R. RIDDELL, F. L. GRAHAM, AND D. C. JOHNSON. 1994. A CYTOSOLIC HERPES SIMPLEX VIRUS PROTEIN INHIBITS ANTIGEN PRESENTATION TO CD8+ T LYMPHOCYTES. *CELL* 77 (4):525-35.

YOUNG, J. W., P. SZABOLCS, AND M. A. MOORE. 1995. IDENTIFICATION OF DENDRITIC CELL COLONY-FORMING UNITS AMONG NORMAL HUMAN CD34+ BONE MARROW PROGENITORS THAT ARE EXPANDED BY C-KIT-LIGAND AND YIELD PURE DENDRITIC CELL COLONIES IN THE PRESENCE OF GRANULOCYTE/MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR AND TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA. *J EXP MED* 182 (4):1111-9.

ZELLER, J. C., A. PANOSKALTSIS-MORTARI, W. J. MURPHY, F. W. RUSCETTI, S. NARULA, M. G. RONCAROLO, AND B. R. BLAZAR. 1999. INDUCTION OF CD4+ T CELL ALLOANTIGEN-SPECIFIC HYPORESPONSIVENESS BY IL-10 AND TGF-BETA. *J IMMUNOL* 163 (7):3684-91.

ZHANG, Y. L., Y. J. GUO, LI BIN, AND S. H. SUN. 2009. HEPATITIS C VIRUS SINGLE-STRANDED RNA INDUCES INNATE IMMUNITY VIA TOLL-LIKE RECEPTOR 7. *J HEPATOL* 51 (1):29-38.

ZHONG, J., P. GASTAMINZA, J. CHUNG, Z. STAMATAKI, M. ISOGAWA, G. CHENG, J. A. MCKEATING, AND F. V. CHISARI. 2006. PERSISTENT HEPATITIS C VIRUS INFECTION IN VITRO: COEVOLUTION OF VIRUS AND HOST. *J VIROL* 80 (22):11082-93.

ZHOU, L., M. M. CHONG, AND D. R. LITTMAN. 2009. PLASTICITY OF CD4+ T CELL LINEAGE DIFFERENTIATION. *IMMUNITY* 30 (5):646-55.

ZHOU, L. J., AND T. F. TEDDER. 1996. CD14+ BLOOD MONOCYTES CAN DIFFERENTIATE INTO FUNCTIONALLY MATURE CD83+ DENDRITIC CELLS. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 93 (6):2588-92.

ZIBERT, A., H. MEISEL, W. KRAAS, A. SCHULZ, G. JUNG, AND M. ROGGENDORF. 1997. EARLY ANTIBODY RESPONSE AGAINST HYPERVARIABLE REGION 1 IS ASSOCIATED

WITH ACUTE SELF-LIMITING INFECTIONS OF HEPATITIS C VIRUS. *HEPATOLOGY* 25 (5):1245-9.

ZINKERNAGEL, R. M., AND P. C. DOHERTY. 1974. IMMUNOLOGICAL SURVEILLANCE AGAINST ALTERED SELF COMPONENTS BY SENSITISED T LYMPHOCYTES IN LYMPHOCYTIC CHORIOMENINGITIS. *NATURE* 251 (5475):547-8.