

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1 ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Présentée par

Laurissa OUAGUIA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Discipline: Aspect moléculaires et cellulaires de la Biologie

Spécialité: Immunologie

ROLE DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS HUMAINS DANS L'ECHAPPEMENT DE LA MALADIE ASSOCIEE A L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE C

Soutenue le vendredi 16 octobre 2015

Devant le jury composé de :

Pr Michel SALZET	Président du Jury
Dr David DURANTEL	Rapporteur
Dr Stéphane DEPIL	Rapporteur
Dr Filoména CONTI	Examineur
Pr Sébastien DHARANCY	Examineur
Pr Christophe LEFEBVRE	Invité
Dr Nadira DELHEM	Directeur de thèse

La science n'a jamais tout à fait raison, mais elle a rarement tout à fait tort... Il est donc rationnel de l'accepter à titre d'hypothèse.

Bertrand, 3ème comte Russell of Kingston

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier particulièrement le **Professeur Michel Salzet** qui a accepté de présider mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour tous vos conseils qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Je remercie très sincèrement les **Dr Stéphane Dépil** et **Dr David Duranfel** qui ont donné de l'intérêt à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Je vous prie de trouver ici la marque de ma profonde reconnaissance.*

*Mes remerciements les plus sincères aux **Dr Filomena Consi** et **Dr Sébastien Dharancy** qui ont spontanément accepté d'être les examinateurs de cette thèse. Je vous suis très reconnaissante de l'enthousiasme avec lequel vous vous êtes impliqués dans mon travail de thèse.*

*Je remercie le **Dr Christophe Pefèvre** qui a accepté de participer à ce jury en tant qu'invité. Votre présence témoigne de l'intérêt que vous portez à ce travail et je vous en remercie.*

*Ma profonde gratitude au **Docteur Nadira Delhem** qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son équipe de recherche. Merci de m'avoir fait redécouvrir l'immunologie. Merci aussi pour ces gâteaux délicieux dont vous seule savez le secret. Merci pour votre patience, votre disponibilité et surtout vos judicieux conseils, qui ont grandement contribué à alimenter ma réflexion. Vous m'avez guidé et orienté pendant ces 3 années de doctorat. Merci pour votre investissement et votre suivi rigoureux. Que ce manuscrit atteste de la profonde reconnaissance que je vous porte. Un grand merci madame.*

Quel difficile exercice que de synthétiser les remerciements que je voudrais adresser aux différentes personnes que j'ai rencontrées et appréciées durant ce parcours de jeune chercheur-doctorant ainsi qu'aux personnes qui m'ont soutenu depuis bien plus longtemps ? La version finale de mon manuscrit achevée, c'est avec bonheur que je satisfais à cet exercice. Toutes mes excuses aux personnes que je pourrais oublier (vous connaissez ma mémoire ou plutôt mon absence de mémoire 😊), mes remerciements vont également vers vous.

*Mes remerciements vont à l'endroit des **Dr Bernard Sablonnière** et **Dr Philippe Delannoit**, Directeur et Co-directeur de l'école doctorale BSL 446. Merci pour vos nombreux conseils et pour votre disponibilité.*

*Je voudrais adresser toute ma gratitude au **Dr Ivan De Launois**, directeur de l'unité mixte de recherche CNRS-8161 qui m'a chaleureusement accueilli et qui m'a suggéré quelques idées subtiles pour perfectionner ce travail.*

*Je remercie également le **Dr Philippe Bousin**, directeur de l'Institut de Biologie de Lille. Votre bienveillance à contribuer au bon déroulement de cette thèse.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères aux **Dr Olivier Morales** et **Dr Ohafer Mrizak** dont les compétences, la disponibilité et les réflexions scientifiques ont fait progresser ce travail. J'ai eu plaisir de découvrir les subtilités des statistiques et les techniques d'isolement auprès de vous. Merci aussi pour votre aide précieuse et votre disponibilité.*

*Je pense bien évidemment au **Dr Hayet Raza**, **Chantal Samson**, **Rami Mustapha**, **Céline Ingeleare**, **Hamza Aboussemdai**, **Sara Renaud** dont la gentillesse et les échanges ont été pour moi un grand soutien et une aide précieuse. Merci pour toute cette bonne humeur contagieuse.*

Une pensée spéciale pour Benoit Van-Damme, Pierre Adrien Pinson, Manon Devreese, Samah Sfaxi, etc., que j'ai eu le privilège former. J'espère vous avoir communiqué ma passion pour la recherche et vous avoir donné envie de continuer dans cette voie.

Je tiens à exprimer ma très grande considération aux Dr Lynda Aboufekane, Dr Khadoun Ghazal, Dr Yvon Calmus et à toute l'équipe du Dr Filomena Consi. Merci pour vos conseils et votre précieuse collaboration. Merci pour vos encouragements et les déjeuners savoureux après les réunions.

Merci aux Dr Nathalie Martin, Dr Martine Duterque, Dr Sébastien Hajolles, Dr Gauthier Goormachtich et Dr Jérôme Vicoigne pour l'aide précieuse et pour les conseils avisés que vous m'avez apportés.

Merci à Sarah Mekki, Racha Dernaika, Carine Delliaux et Magalie Sénéchal pour votre bonne humeur, votre amitié et nos petits moments de folie, . . . Surtout les vôtres !

Je tiens également à remercier Mmes Nathalie Tomavo, Annes Claire Florens et à toute l'équipe ETS. Merci pour votre bonne humeur, vos conseils et votre convivialité.

Un merci tout spécial pour les membres de l'association Bio Addoct : Ismaël, Julien, François, Cindy, Marine, Marie, Germain, Omar, etc. C'est un réel plaisir d'avoir œuvré à vos côtés pour raviver la flamme de Bio Addoct. Bioaddoctement. . .

Merci à Madjda, Rémi, Pascal, Martin, Marion, Jo, Jinskuang, etc. pour votre bonne humeur et vos conseils.

Je remercie tous les membres de la plateforme BICEL, les membres de l'UMR 8161 et l'ensemble du personnel administratif. Vos conseils et votre disponibilité ou tout simplement votre bonne humeur m'a aidé à réaliser ce travail dans d'excellentes conditions.

Plus que quiconque, papa Robert, Maman Céline, je vous dis Merci.

Merci pour toutes ces choses que vous faites et ne faites pas pour moi.

Ce travail est pour vous montrer mon amour et ma gratitude.

Je vous aime. « De schew pepoung »

Merci à mon fils, Faroude Fofue, pour sa joie de vivre et son bonheur contagieux! Tu me manques fort. J'espère que tu prends bien soin de ta maman.

Un merci tout spécial à Ma grande sœur tata Joberse Monkam. Ton investissement dans mon éducation mais surtout dans ma scolarité a permis que je puisse soutenir aujourd'hui une thèse de doctorat. Ce diplôme est donc un peu (beaucoup même) le tien. Grand merci grande sœur, Que Dieu te garde.

À mes frangins et frangines Léonid Wachou, Harold Sio, Jikelle Nouahom et Trécy Guiadem. Par où commencer, vous êtes les étoiles de mon système solaire car vous m'avez toujours entouré et soutenu. Merci d'avoir si grand cœur et surtout merci de me donner autant d'amour. Cette thèse est aussi la vôtre. Merci.

À mes sœurs de cœurs, Lesly Tchumbiep et Rosine Mezatio, belles et intelligentes. Je n'aurai certainement pas pu accomplir ceci sans votre soutien physique et moral. Vous m'avez aidé à traversé les périodes plus compliquées et m'avez insufflé de l'énergie pour continuer. Puisse Dieu me donner le bonheur et le privilège de vos avoir toujours auprès de moi.

À tonfon Joseph Sio, merci pour tout le soutien, pour l'aide et pour tous les conseils que tu me donnes. Je n'ai pas assez de mots pour te dire combien je te suis reconnaissante. Mille fois merci tonfon.

À toi Colombe Yaha. Tu es certainement l'une des personnes qui méritent le plus mes remerciements. Merci d'e m'avoir supporté (ou plutôt de ne pas avoir eu à me supporter car je n'étais pas souvent là 😊). Merci pour ton soutien, pour ta patience et pour tes conseils si précieux. Que Dieu te garde.

Merci à toi Dianney Tegua. Tu as toujours cru en moi-même quand je doutais de mes aptitudes. Merci de m'avoir accompagné et de me soutenir quoi qu'il advienne. Merci

Un merci spécial pour Christian Bikong. Pour ton soutien, tes conseils et surtout pour les courses à 21h. Merci de m'avoir écouté et conseillé pendant ces années. Un grand Merci .

Un grand merci également à l'équipe d'animation de l'Église St Sébastien, aux membres de la chorale vois des anges et aux membres du groupe liturgique. Merci pour toutes vos prières et pour votre sollicitude. Soyez bénis.

Merci à vous, Guyso, Pacha, Junior, Thomas, Gildas, Placid, Sam, Benji et Geovany. Vous êtes des amis précieux et j'ai de la chance de vous avoir. You know why!

À tata Michelle, tata Pulcherie, ton-ton Michel, ton-ton Daniel, tata Pélagie ton-ton Justin, maman Bernadette, ton-ton Ibrahim, ton-ton Séverin, etc. Merci pour votre soutien et pour vos conseils.

Plus que quiconque, Je remercie Dieu,

Le Seigneur tout puissant et bienveillant.

Pour m'avoir donnée la force, la volonté et la patience

Durant toutes ces années de thèse.

Merci d'être toujours auprès de moi

Et auprès de ma famille. Soit béni !

La science, il est vrai, ne progresse qu'en remplaçant partout le Pourquoi par le Comment...

André Gide

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	i
ABBREVIATIONS	iii
INTRODUCTION	
AVANT PROPOS	v
I- L'HEPATITE C	1
A/ GENERALITES	1
1- Historique	1
2- Données épidémiologiques	1
3- Modes de transmission et facteurs de risque	2
4- Caractéristiques et manifestations cliniques de la maladie	3
5- Histoire naturelle et pathogénèse	4
5.1- Hépatite C aiguë	5
5.2- Hépatite C fulminante	7
5.3- Hépatite C chronique	7
5.4- Fibrose et Cirrhose virale C	8
5.5- Carcinome hépatocellulaire	10
5.6- Manifestations extra-hépatiques	12
5.7- Persistance virale et récurrence	13
6- Diagnostic clinique et virologique	13
B/ LE VIRUS DE L'HEPATITE C	15
1- Découverte du virus de l'hépatite C	15
2- Structure du virus de l'hépatite C	16
2.1- Les régions non codantes 3' et 5'	18
2.1.1- L'extrémité 3' non codante	18

2.1.2-	L'extrémité 5' non codante	18
2.2 -	Les régions codant les protéines virales	20
2.2.1-	Les protéines structurales	22
2.2.2-	Le polypeptide p7	25
2.2.3-	Les protéines non structurales	26
3-	Variabilité génétique du VHC	35
3.1-	Les 7 génotypes du VHC	35
3.2-	Répartition géographique et distribution en quasi-espèce	36
3.3-	Tropisme cellulaire et compartimentation de la quasi-espèce virale	38
4-	Le cycle viral du VHC	39
4.1-	Attachement, Entrée et internalisation du virus	40
4.2-	Décapsidation et libération du génome	42
4.3-	Initiation de la traduction IRES-dépendante et coiffe-indépendante	43
4.4-	Expression et maturation des protéines virales	43
4.5-	Réplication du génome viral	44
4.6-	Assemblage des néo-virions	44
4.7-	Sécrétion des particules virales infectieuses	44

C/ Modèles d'études du VHC 45

1-	Les modèles <i>in vivo</i>	45
1.1-	Le chimpanzé	45
1.2-	Le tupaia	46
1.3-	Le modèle de rat	46
1.4-	Le modèle de souris	46
2-	Les modèles <i>in vitro</i>	49
2.1-	Infection par les particules dérivées de séra de patients (VHC ser)	50
2.2-	par les modèles de particules virales semblables au VHC (VHC-LPs)	50
2.3-	Infection par pseudo-particules lentivirales ou rétrovirales (VHCpp)	50
2.4-	Les systèmes réplicons	51
2.5-	Forme soluble de l'ectodomaine E2 (sE2)	52
2.6-	Les particules virales infectieuses produites en culture cellulaire VHCcc	52
3-	Avantage de l'utilisation du modèle VHCcc pour nos études	53

II-	TRAITEMENTS DE L'HEPATITE C	54
1-	Histoire et évolution des traitements	54
2-	Les anciens traitements de référence : IFN-PEG/RBV	55
3-	Les traitements DAA de 1ème génération : les inhibiteurs de protéases BOC/TVR	55
4-	Les traitements DAA de 2nde génération : Sofosbuvir, Lédipasvir, Daclatasvir	56
5-	Les traitements en cours de développement : vers le « Perfectovir »	57
6-	Les facteurs influençant la réponse immune	58
6.1-	Les facteurs virologiques	58
6.2-	Les facteurs liés à l'hôte	59
III-	LE SYSTEME IMMUNITAIRE	60
A/	LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LES LYMPHOCYTES T	60
1-	Généralités	60
2-	Ontogenèse des lymphocytes T	60
3-	Sélection thymique des lymphocytes TCD3+	63
4-	Développement et organisation du récepteur à l'antigène : le TCR	65
5-	Structure du complexe TCR/CD3 et transduction du signal	67
6-	Fonctions des cellules T	71
6.1-	Fonction des lymphocytes TCD8+	71
6.2-	Fonction des lymphocytes TCD4+ et complexité du lignage	71
B/	LA REPONSE IMMUNITAIRE DANS L'HEPATITE C	76
1-	Généralités	76
2-	L'immunité Innée et l'hépatite C	78
2.1-	Les cellules dendritiques	79
2.2-	Les macrophages	80
2.3-	Les cellules NK	81
3-	L'immunité adaptative et l'hépatite C	82
3.1-	Réponse immune à médiation humorale dans l'hépatite C	83
3.2-	Réponse immune à médiation cellulaire dans l'hépatite C	84

4- Réponse immunitaire et échappement du virus	89
C/ LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS CD4+	90
1- Histoire de la découverte des cellules régulatrices	90
2- Rôle des lymphocytes T régulateurs dans la tolérance immunitaire	91
3- Les différentes sous populations de cellules régulatrices	91
3.1- les cellules dendritiques régulatrices	92
3.2- Les lymphocytes B régulateurs ou Breg	92
3.3- Les macrophages régulateurs	92
3.4- les lymphocytes T régulateurs	93
3.4.1- Les lymphocytes TCD8+ régulateurs	93
3.4.2- Les cellules NKT régulatrices	93
3.4.3- les lymphocytes TCD4+ régulateurs	93
D/ LES LYMPHOCYTES T CD4+ REGULATEURS INDUITS	100
1- Définition	100
2- Caractérisation phénotypique et fonctionnelle	100
E/ LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS NATURELS CD4+CD25+CD127-FOXP3+	102
1- Définition	102
2- Caractérisation phénotypique	103
3- Caractérisation fonctionnelle	107
3.1- Les mécanismes dépendant de la sécrétion des cytokines immunosuppressives	107
3.2- Les mécanismes contact-cellulaires dépendants	110
3.3- Les mécanismes dépendant de l'induction de la cytolyse	114
4- Les fonctions physiologiques et physiopathologiques des Treg	116
4.1- Treg et tolérance foëto-maternelle	116
4.2- Treg et tolérance en transplantation d'organe	117
4.3- Treg et maladies auto-immune	117
4.4- Treg et allergies	118
4.5- Treg et immunité anti tumorale	118
4.6- Treg et immunité anti-infectieuse	119

F/ ROLE DES TREG DANS L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE C	120
1- Fréquence des Treg dans l'évolution de l'hépatite C	120
2- Rôle protecteur des Treg dans l'hépatite C	120
3- Contribution des Treg dans la pathogenèse de l'hépatite C	121
4- Rôle des Treg dans la persistance du VHC	122
CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE	124
RESULTATS	126
Article 1	127
Article 2	131
Article 3	137
DISCUSSION-CONCLUSION	141
MOT DE LA FIN : POUVONS-NOUS DIRE ADIEU A L'HEPATITE C ?	158
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	160
ANNEXES	
Article 4	216
Article 5	219
Article 6	221
Article 7	224
1- Communications-Congrès	225
2- prix et récompenses obtenu(e)s	227
3- Formations doctorales	229

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Prévalence mondiale de l'hépatite C en 2010

Figure 2 : Evolution de l'hépatite C au cours du temps

Figure 3 : Caractéristiques sérologiques de l'hépatite C aiguë

Figure 4 : Caractéristiques sérologiques de l'hépatite C chronique

Figure 5 : Cause et nombre de décès par maladie chronique hépatique dans le monde en 2010. Entre 1990 et 2010

Figure 6 : Progression de l'hépatocarcinogénèse virale C

Figure 7 : Histoire de l'identification et la découverte moléculaire du virus de l'hépatite C.

Figure 8 : Structure du virus de l'hépatite C

Figure 9 : Organisation du génome du virus de l'hépatite C

Figure 10 : Structure secondaire et Représentation 3D de l'IRES VHC.

Figure 11 : Fonctionnement de l'IRES VHC dans l'initiation de la traduction

Figure 12 : Organisation du génome du virus de l'hépatite C

Figure 13 : Fixation de la protéine Core du VHC sur le récepteur TLR-2

Figure 14 : Complexe de réplication du VHC

Figure 15 : Fixation de la protéine du VHC sur les récepteurs membranaires TLR-2 et TLR-1/6 ainsi que le clivage de TRIF et CARDIF par le complexe NS3/4A

Figure 16 : Représentation de la structure cristalline du complexe NS3/4A du virus de l'hépatite C

Figure 17 : Structure cristalline de la polymérase NS5B du virus de l'hépatite C

Figure 18 : Arbre d'évolution phylogénétique des 7 géotypes de VHC et des 67 sous types

Figure 19 : Représentation schématique du cycle viral du VHC

Figure 20 : Mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite C et rôle des principaux récepteurs

Figure 21 : Représentation schématique du réplicon subgénomique développé pour l'étude du VHC

Figure 22 : Histoire de l'évolution des traitements depuis la découverte du VHC

Figure 23 : Classification des traitements actuels et futurs de l'hépatite C en fonction de l'efficacité et du niveau de tolérance

Figure 24 : Ontogénèse des lymphocytes T

Figure 25 : Schématisation du processus de différenciation thymique des lymphocytes T.

Figure 26 : Organisation du complexe TCR/CD3

Figure 27 : Mécanismes de transduction de signal dans les lymphocytes T CD3+

Figure 28 : Activation des lymphocytes T et implications des 3 signaux d'activation.

Figure 29 : Les quatre principaux lignages des cellules CD4+ : Th1, Th2, Th17 et Treg

Figure 30 : Plasticité des cellules T helper

Figure 31 : Infection par le VHC, réponse immune innée dans le foie et rôle central de l'IFN.

Figure 32 : Rôle de l'interféron et de l'immunité adaptative dans l'infection par le VHC

Figure 33 : Infection par le VHC et réponse immune adaptative

Figure 34 : Ontogenèse des lymphocytes T régulateurs naturels et des lymphocytes T régulateurs induits

Figure 35 : les Treg sécrètent les cytokines immunosuppressive IL-10, TGF- β et IL35 pour inhiber la fonction des cellules effectrices

Figure 36 : Les perturbations métaboliques provoquées par les Treg sur leurs cibles

Figure 37 : Mécanisme de suppression des Treg par contact-cellulaire

Figure 38 : Mécanisme de suppression des Treg par induction de la lyse cellulaire

Figure 39 : Mécanismes de suppression des Treg

TABLEAUX

Tableau 1 :: Estimation du risque d'infection par le VHC selon le mode de transmission.

Tableau 2 : Score de METAVIR représentant les modifications architecturales permettant l'évaluation quantitative des cinq stades de la fibrose (F0 à F4)

Tableau 3 : Manifestations extra-hépatiques fréquemment associées à l'hépatite C

Tableau 4 : Principaux rôles et fonctions des 10 protéines du VHC et de la protéine F/ARFP

Tableau 5 Distribution globale des différents génotypes du virus de l'hépatite C

Tableau 6 Spécificités et limites des modèles utilisés pour l'étude *in vivo* du VHC

Tableau 7 Spécificités et particularité des modèles utilisés pour l'étude *in vitro* du VHC

Tableau 8 Chronologie de l'expression des gènes après formation du complexe CMH/Ag-TCR

Tableau 9 : Expression des marqueurs et cytokines spécifiques des lymphocytes TCD4+ régulateurs

ABREVIATIONS

ADN :	Acide DesoxyriboNucleique	GTP :	Guanosine TriPhosphate
ALAT :	Alanine Amino-Transferase	GVHD :	Graft Versus Host Disease
AMPc :	Adenosine Monophosphate cyclique	VHCcc:	virus de l'hépatite C produit en culture cellulaire
AP-1 :	Activator protein 1	HDL :	High Density Lipoprotein
ARN :	Acide ribonucléique	HSV :	Herpes Simplex Virus
Blimp-1 :	B lymphocyte-induced maturation protein-1	IBD :	Inflammatory Bowel Disease
CCL:	Chemokine (C-C motif) ligand	ICAM :	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
CCR :	Chemokine Receptor	ICOS :	Inducible T-cell costimulator
CD :	Cluster of Differentiation	iDC :	immature Dendritic Cell
CHC :	Carcinome hépatocellulaire	IDO :	Indolamine 2,3 dioxygénase
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	IFN :	Interféron
CMV :	CytoMegalo Virus	Ig:	Immunoglobulin
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène	IL :	Interleukine
CsA :	Cyclosporine A	IP3 :	inositol-1,4,5-triphosphate
CTL :	Cytotoxic T Lymphocyte	IPEX :	Immunodysregulation polyendocrinopathy X-linked syndrome
CTLA-4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4	ITAM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
CXCR:	C-X-C chemokine receptor	iTreg :	Lymphocytes T régulateurs induits
CyP :	Cyclophiline	JFH1 :	japanese fulminant hepatitis 1
DC:	Dendritic Cell	JNK :	c-Jun NH2-terminal Kinases
DAG:	DiAcyl Glycerol	kDa :	Kilo Dalton
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium	KO:	KnockOut
DN :	double négative	LAG 3:	Lymphocyte-activation gene 3
DP :	double positive	LAT :	Linker for Activation of T cells
EBV :	Epstein Barr Virus	LCMV :	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
EGFR:	Epiderman growth factor receptor	LDLR:	Low Density Lipoprotein Receptor
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	L-SIGN:	Liver/Lymph node-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin
Erk:	Extracellular signal Regulated protein Kinase	MAPK:	Mitogen Activated Protein Kinase
Foxp3:	Forkhead box Protein 3	MDSC :	Myeloid-Derived Suppressor Cell
FR4 :	Folate Receptor 4	MMF :	Mycophénolate mofétil
GAG :	Glycosaminoglycane	MPA :	Mycophenolic acid
Gal :	Galactine	MSC :	Mesenchymal Stem Cell
GATA3 :	GATA binding protein 3	mTEC :	Medullar Thymic Epithelial Cells
GFP :	Green Fluorescent Protein	mTOR :	Mamalian Target Of Rapamycin
gp:	glycoprotéine	N-FAT :	Nuclear Factor of Activated T cells
GITR :	Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor	NF-kB :	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Grb2:	Growth factor receptor-bound protein 2	NK :	Natural Killer

NKT :	Natural Killer T cells	STAT :	Signal Transduction And Transcription
NS :	Non Structurale	SVR :	Sustained viral response
Nrp-1 :	Neuropilin-1	Tac:	Tacrolimus
nTreg	Lymphocytes T régulateurs naturels	TCR:	T Cell Receptor
or			
Treg :		Teff:	T effecteur
OCLN :	Occludine	TGF:	Transforming Growth Factor
OMS :	Organisation Mondiale de la Sante	Th:	T helper
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cell	TH :	Transplantation Hepatique
PCR :	Polymerase Chain reaction	TIL:	Tumor-Infiltrating Lymphocyte
PD1 :	Programmed Death 1	TH :	Transplantation hépatique
pDC :	Plasmacytoid Dendritic Cell	TLR :	Toll Like Receptor
PiP2 :	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate	TNF :	Tumor Necrosis factor
PI3k:	phosphatidylinositol-3-OH kinase	TNFR :	Tumor Necrosis factor receptor
PIP:	phosphatidylinositol-3-phosphate	Tr1 :	Treg induit de type 1
PKC:	Protein Kinase C	TRAIL :	Tumor necroses factor Related Apoptosis Inducing Ligand
PLC :	Phospholipase C	VEGF:	Vascular Endothelial Growth factor
pTα :	Pre-chaine α du TCR	VHA :	Virus de l'hépatite A
RAG :	Recombination-activating genes	VHB :	Virus de l'hépatite B
RE :	Reticulum Endoplasmique	VHC :	Virus de l'hépatite C
RORyt :	Retinoic acid-related Orphan Receptor γ t	VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
siRNA:	Small interfering RNA	XLAAD :	X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome
SCARB	Scavenger Receptor Class B type I	ZAP-70 :	Zeta chain-Associated Protein kinase 70
I:			
SP :	Simple Positif		

INTRODUCTION

AVANT PROPOS

Chers membres du Jury, Chers lecteurs,

Cette introduction a été divisée en trois grandes parties dans le but de faciliter la lecture du manuscrit et de présenter chronologiquement la problématique et le contexte des travaux réalisés au cours de ces trois années de doctorat.

La première partie de mon introduction présente l'hépatite C et son agent causal, le virus de l'hépatite C. Celle-ci commence par des généralités sur l'histoire et la pathogenèse de l'hépatite C suivie d'une description du virus de l'hépatite C et des particularités de son cycle viral. Par la suite, vous est présentée une description des différents modèles *in vivo* et *in vitro* qui sont utilisés pour l'étude de cette pathologie.

Dans la deuxième partie de mon introduction, vous seront présentés l'histoire et l'évolution des traitements, les progrès qui restent à faire et l'implication du système immunitaire dans la réponse à ces traitements.

Enfin, la troisième partie introduit le système immunitaire et le rôle central des lymphocytes T régulateurs. Cette partie débute par une présentation générale du système immunitaire suivi par une description détaillée de l'ontogenèse et de la fonction des lymphocytes T. Par la suite, le rôle des réponses immunes innées et adaptatives dans l'hépatite C est décrit, avec un focus sur l'importance des différentes populations de lymphocytes TCD4+. Il vous sera ensuite présenté une description des différents types de cellules régulatrices et en particulier des lymphocytes T régulateurs. Par ailleurs, une description plus approfondie de deux sous populations de lymphocytes T régulateurs, à savoir, les cellules Tr1 dites « induits de type 1 » et les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD127-FOXP3+ dits « naturels » (nTreg ou Treg) vous sera faite. Vous pourrez alors suivre l'histoire de la caractérisation de ces populations, la découverte progressive des différents marqueurs, les facteurs impliqués dans leur développement et leur fonction dans les situations physiologiques et physiopathologiques. Finalement, l'implication de ces lymphocytes T régulateurs dans l'hépatite C sera présentée. Ce dernier chapitre exposera les données de la littérature concernant la fréquence et le rôle (protecteur ou pathologique) des Treg dans l'hépatite C mais surtout, elle permettra d'évaluer l'implication des Treg dans la pathogenèse et la persistance du virus de l'hépatite C.

I - L'HEPATITE C

A/ GENERALITES

1- Historique

Durant plusieurs décennies et jusqu'au début des années 1970s, les hépatites virales étaient cliniquement subdivisées en deux pathologies distinctes : l'hépatite infectieuse ou hépatite A caractérisée par une période d'incubation très courte (quelques semaines) et l'hépatite B encore appelée hépatite du Sérum caractérisée par une période d'incubation plus longue (quelques mois) [1, 2]. Cependant, le développement de techniques microbiologiques plus sensibles a mis en lumière une troisième forme d'hépatite virale acquise en post-transfusion, qui a été appelée hépatite NANB « non-A, non-B » [3-5]. Cette pathologie était caractérisée par une chronicité plus importante et une pathologie le plus souvent asymptomatique. En 1984, une étude pilote sur dix patients NANB positifs a montré l'inefficacité des traitements anti-VHB et anti-VHA sur ces patients, renforçant considérablement l'idée de la présence d'un agent pathogène différent [6]. C'est en 1989 que l'équipe de Michael Houghton (Chiron Corporation, Emeryville, Californie, Etats-Unis) a mis en évidence le génome de l'agent étiologique de l'hépatite NANB, appelé virus de l'hépatite C (VHC) [7].

2- Données épidémiologiques

L'hépatite C est la cause majeure d'hépatopathies chroniques dans les pays développés [8]. Dans le monde, près de 180 millions de personnes sont infectées par le virus de l'hépatite C et on estime que 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année [9]. En effet, il existe un gradient nord-sud de l'hépatite C car elle est très inégalement répartie dans la population mondiale. Ainsi, la prévalence de l'hépatite C est faible dans les pays nordiques mais très élevée dans certaines régions sous développées. Ainsi, les zones à prévalence élevée sont en Afrique et en Asie où le taux dépasse les 10 % tandis que les zones à faible prévalence sont en Europe occidentale avec une prévalence d'environ 2 % [10]. En fonction des continents, la répartition de l'hépatite C est la suivante: Amérique (1.5%), Afrique (10%), Europe (2.3%), Océanie et Australie (1.2%) [11]. L'Egypte est le pays le plus touchés par le VHC avec environ 18-22% de la population infectée [8, 12]. En Egypte, la prévalence élevée est due aux injections qui ont été faites aux patients souffrant de bilharzioses et schistosomiasis dans les années 90s. Ainsi, l'utilisation du matériel non stérile a

grandement favorisé la dissémination de cette pathologie [13, 14]. La Suède est le pays le moins affecté par l'hépatite C avec une incidence inférieure à 0.003% [8]. La France quant-à elle possède une faible endémicité pour le virus de l'hépatite C avec une prévalence d'environ 0.84% [15-17]. D'ici 2030, le nombre total de personnes infectées par le virus de l'hépatite C devraient considérablement baisser tandis que les pathologies hépatiques graves associées au VHC devraient croître [18, 19]. La figure 1 représente la distribution globale de l'hépatite C dans le monde.

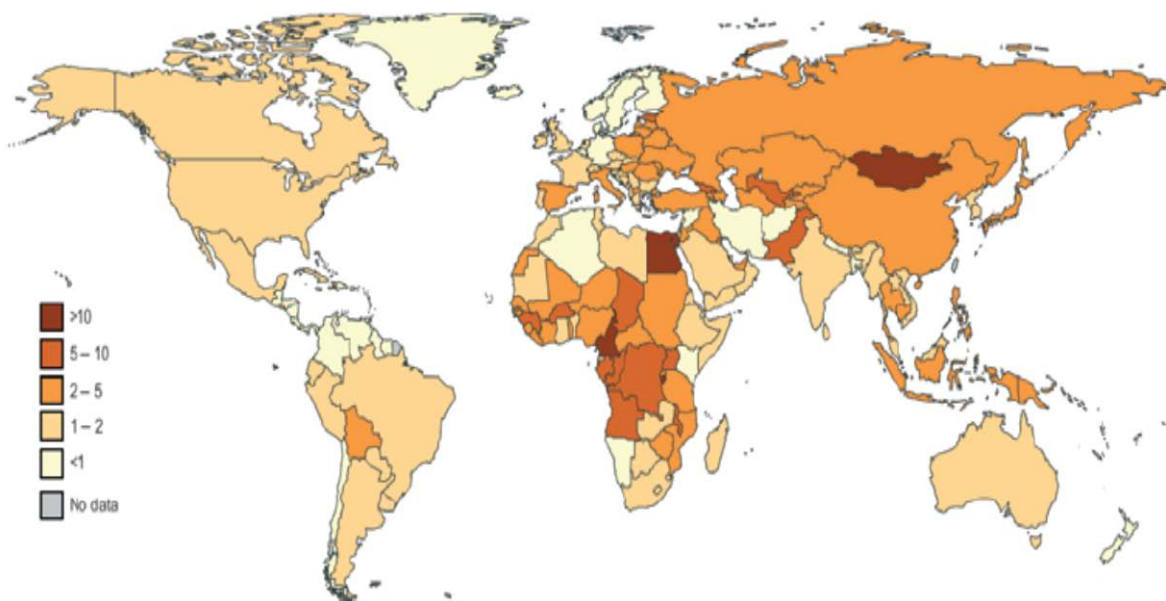


Figure1 : Prévalence mondiale de l'hépatite C en 2010. L'hépatite C a une distribution mondiale variable et se manifeste chez les personnes de tout âge, de tout sexe et de toute race. Les régions du monde les plus touchées sont en Afrique et en Asie. Le pays le plus touché est l'Égypte (>18%). En France, la prévalence est de moins d'1%. D'après *Lavanchy, D, Clinical Microbiology and Infection 2011.*

3- Modes de transmission et facteurs de risque

Le VHC se transmet principalement par voie parentérale, par le contact direct avec du sang ou avec des produits sanguins contaminés. Avant 1992, aucun test diagnostique n'était disponible et le principal mode de contamination survenait lors de transfusions sanguines. De nos jours, les modes de transmissions majeures sont l'utilisation de drogues injectables, de seringues et autres instruments contaminés (moyen de contamination privilégié), infections nosocomiales, transfusions sanguines et utilisation de matériels non stériles, scarifications, coupures, piercings, acupuncture, tatouages et immigration en provenance de pays endémiques [20-22]. En effet, la mise en place des réglementations concernant les donneurs de sang telles que l'évaluation des transaminases et

l'utilisation des tests VHC spécifiques (en majorité dans les pays développés) ont permis de diminuer considérablement le nombre d'infections post transfusionnelles (1 cas pour 6000000 dons) même si ce mode de transmission reste encore important dans les pays en voie de développement [23]. Bien que des cas d'exposition nosocomiales entre patients-VHC+ et personnels soignants existent, cette transmission reste très faible (4 cas pour 10000). De plus, le respect des règles d'hygiène et la généralisation de l'usage unique des matériels hospitaliers ont permis de limiter ce mode de transmission [23]. Le mode de transmission par voie sexuelle reste très faible (environ 9%) car le VHC n'a été détecté qu'à l'état de traces dans les sécrétions sexuelles [24]. Par ailleurs, les infections verticales (de la mère à l'enfant) représentent moins d'1% des cas recensés et la césarienne diminuerait ce mode de transmission [24-27]. Cependant, chez 20% des patients, le mode d'infection reste inconnu [28]. Des études suggèrent que la première apparition du VHC chez l'homme résulterait d'une transmission zoonotique à partir d'un chimpanzé infecté ou d'une infection des ancêtres de l'homme qui aurait perduré au cours de l'histoire de l'évolution [29]. Le tableau 1 présente les différents modes de transmission du virus de l'hépatite C.

Type d'exposition	Risque (%)
Transfusions sanguines, infections nosocomiales	10
Utilisations de drogues injectables et de matériels contaminés	60
Transmission verticale (mère-enfant)	1
Voies sexuelles (principalement chez les homosexuels)	9
Modes de transmission inconnus	20

Tableau 1 : Estimation du risque d'infection par le VHC selon le mode de transmission. Les principaux modes de transmission du VHC sont par ordre d'importance : l'utilisation du matériel contaminé chez les utilisateurs de drogues injectables, modes de transmissions inconnus, transfusions sanguines et les contaminations nosocomiales. *D'après Laurissa Ouaguia, 2015.*

4- Caractéristiques et manifestations cliniques de la maladie

L'hépatite chronique C est une maladie virale mais aussi une maladie hépatique. Elle représente la 2^{ème} cause de cirrhose et de cancer du foie et elle est la 2^{ème} indication de transplantation hépatique [30]. Les manifestations cliniques de l'hépatite C sont successivement l'hépatite C aiguë,

l'hépatite C chronique, la fibrose, la cirrhose virale C et le carcinome hépatocellulaire (CHC). L'hépatite C peut donc être très grave avec des conséquences désastreuses. Des symptômes peuvent apparaître durant la phase d'hépatite aiguë dès 2 semaines à 6 mois après l'infection. Cependant, chez la majorité des personnes, l'hépatite C se développe plusieurs années après l'infection sans que le patient ne présente de symptômes apparents. C'est pourquoi l'hépatite C est souvent dite asymptomatique [31]. De tels patients sont appelés porteurs sains mais ces derniers sont néanmoins hautement contagieux. En effet, les porteurs asymptomatiques possèderaient une charge virale plasmatique d'environ 50 millions/mL [32]. Lorsque la maladie se déclare enfin, elle se manifeste par l'expression de nombreux signes cliniques et symptômes plus ou moins caractéristiques : ictère, asthénie, fièvre, douleurs musculaires, nausées, hépatalgies, pertes d'appétit, vomissements, douleurs articulaires, colorations des fèces et des urines. Certains travaux révèlent que les patients chroniquement infectés par le VHC possèdent des taux de cholestérol et de triglycérides significativement plus élevés que les sujets sains et une activité sérique des alanines aminotransférases (ALAT) et gamma-glutamyl-transpeptidases (γ -GT) plus importantes. Par ailleurs, l'histologie hépatique de ces patients révèle une activité nécrotique et inflammatoire plus avancée pouvant évoluer vers la fibrose hépatique [33, 34].

5- Histoire naturelle et pathogénèse

L'histoire de l'hépatite C est caractérisée par un risque élevée de chronicité. En effet, après contamination par le VHC, le patient développe une hépatite C aiguë qui peut être symptomatique dans 10-15% des cas mais le plus souvent asymptomatique (dans environ 90% des cas) [8]. 20% des patients voient une résolution spontanée de leur hépatite [35]. Par ailleurs, des travaux ont révélés que les patients symptomatiques ont plus de chance de guérir spontanément de la maladie que les patients asymptomatiques [8]. Cependant, la maladie devient chronique chez environ 70-80% des patients. En l'absence de traitements efficaces, cette chronicité peut engendrer une fibrose puis une cirrhose virale C (chez environ 20% des patients). Au stade de cirrhose, le risque de développer un cancer du foie est très élevé. En effet, 4-5% des patients chroniquement infectés par le VHC développent un carcinome hépatocellulaire un délai de 20 à 30 ans après la contamination [30, 31, 36-38]. La figure 2 est une représentation schématique de l'histoire naturelle de l'évolution de l'hépatite C au cours du temps.

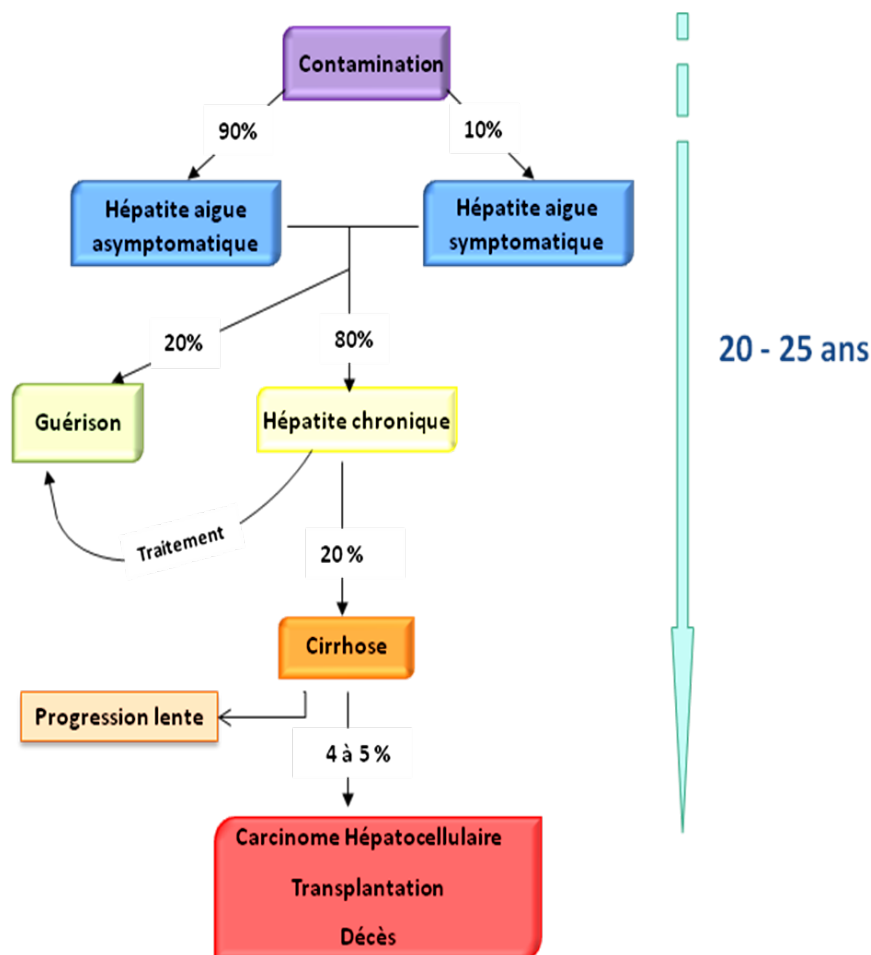


Figure 2 : Evolution de l'hépatite C au cours du temps. Les facteurs qui diminuent le risque de progression vers la cirrhose et CHC sont le sexe féminin et le jeune âge au moment de l'infection. Les personnes avec ce profil favorable n'ont souvent pas de maladie progressive avant 30 ans et plus après l'infection. Les facteurs qui augmentent le risque de progression incluent la consommation d'alcool, l'âge avancé au moment de l'infection, le sexe masculin et les co-infections virales (VHB, VHA, VIH). Les personnes avec ce profil de risque défavorable sont susceptibles de développer des complications dans les 20 ans voire moins après l'infection. Une fois la cirrhose développée, le risque de CHC est de 1 à 4% par an. *D'après Laurissa Ouaguia, 2015.*

Ainsi, après infection par le VHC, 10% des patients présentent des signes cliniques de l'hépatite aiguë et 90% développent une hépatite aiguë asymptomatique [35]. L'apparition de l'hépatite C aiguë est généralement silencieuse d'où la grande difficulté à pouvoir la détecter et l'étudier.

5.1- L'hépatite C aiguë

L'hépatite C aiguë apparaît 2 à 12 semaines après l'infection (généralement à la 7^{ème} semaine). Elle peut être sévère et se prolonger jusqu'au 6^{ème} mois. Il n'existe pas de tests sûrs pour

diagnostiquer cette phase de la maladie. Chronologiquement, 7 à 10 jours après la contamination, l'ARN viral devient détectable par PCR dans le sérum. La charge virale peut alors rapidement atteindre 10^5 à 10^7 UI/ml. Ensuite, les transaminases augmentent dans un délai supérieur à 15 jours (jusqu'à 4 semaines après la contamination) avec un pic pouvant atteindre 10 fois la normale. Enfin, dans un délai de 2 à 12 semaines, les anticorps anti-VHC, caractérisant la séroconversion, apparaissent dans le sérum [39]. L'hépatite aiguë C est généralement diagnostiquée lors d'analyses de contrôle chez les personnes à risques (professionnels de recherche, de santé et utilisateurs de drogues injectables) [8]. La détection de l'infection par le VHC pendant la phase aiguë est très difficile en raison de la faible production d'anticorps anti-VHC, celle-ci survenant généralement après le 3^{ème} mois [40, 41]. En l'absence de détection d'anticorps anti-VHC, le seul moyen efficace de détecter la maladie pendant la phase aiguë demeure la recherche de l'ARN viral par PCR.

Après contamination, 20% des patients, majoritairement symptomatiques, résolvent spontanément la maladie [35]. L'intervalle entre l'infection et la séroconversion peut varier de 6 à 8 semaines chez les porteurs sains ce qui suggère que la guérison spontanée peut survenir avant le développement des anticorps anti-VHC et cette guérison est caractérisée par un niveau d'ARN viral indétectable dans le sang, qui est évalué par 2 contrôles successifs effectués à 6 mois d'intervalle [42]. La phase aiguë de l'hépatite C est caractérisée par des taux d'ALAT 10 fois plus élevés que la normale et par la séroconversion des patients [39]. Cette séroconversion est mise en évidence par la détection des anticorps anti-VHC par des analyses immunologiques et la détection de l'ARN viral par RT-PCR. La figure 3 représente les caractéristiques sérologiques de l'hépatite C aiguë.

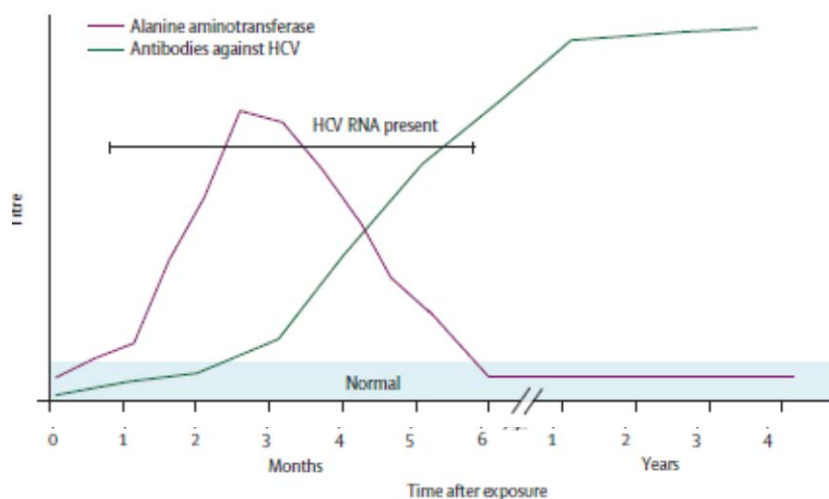


Figure 3 : Caractéristiques sérologiques de l'hépatite C aiguë. Environ 3 mois après infection par le VHC, on observe un pic de transaminases hépatiques suivi quelques semaines après par un pic d'anticorps anti-VHC dans le sang des patients. On note également la présence de l'ARN viral dans le sérum de patient. En cas de guérison spontanée, le taux d'ALAT chute progressivement, le taux d'anticorps reste au plus haut tandis que l'ARN viral devient indétectable 6 mois après la contamination. D'après *Mushahwar, I.K., et al., Am J Clin Pathol, 1981.*

5.2- L'hépatite C fulminante

Dans de rare cas, l'hépatite C aiguë peut être fulminante [39]. En effet, l'hépatite C fulminante représente moins d'1% des hépatites C aiguës. L'un des rare cas avéré d'hépatite C fulminante a été décrit en 1996 chez un homme blanc de 68 ans dans un travail publié par Patrizia Farci et ses collaborateurs [43]. L'hépatite C fulminante se caractérise par un syndrome clinique dramatique associé à une nécrose importante des cellules hépatiques [44, 45]. Elle se manifeste généralement en présence des co-facteurs tels que la co-infection par le VHB/VHA et des taux de virémie élevés [43, 46-48]. Il faut noter que l'isolement de la souche JFH1 du virus de l'hépatite C par le professeur Wakita T. et ses collaborateurs a été réalisé grâce à un patient souffrant d'une hépatite C fulminante [49-51].

5.3- L'hépatite C chronique

L'hépatite C chronique est définie par la présence de l'ARN du VHC plus de 6 mois après la contamination. Elle survient dans 70 à 80% des cas et le risque de passage à la chronicité est plus élevé chez les sujets âgés [32]. Elle persiste des années avec une fluctuation des transaminases indépendamment des symptômes observés alors que la virémie reste relativement stable [52]. On peut distinguer trois types d'hépatites C chroniques : l'hépatite C chronique avec transaminases normales, l'hépatite C chronique minime et l'hépatite C chronique modérée ou sévère. En effet, 10-40% des patients ayant une infection chronique C peuvent avoir des niveaux de transaminases normaux malgré la présence de l'ARN viral dans le sérum et la détection d'anticorps anti-VHC [53, 54]. En outre, environ 50% des patients présentent une hépatite C chronique minime avec un taux de transaminases très modérément élevé et transitoirement normal [55]. Et enfin, environ 25% des patients sont atteints d'hépatite C chronique modérée ou sévère. Ces derniers ont une maladie hépatique cliniquement plus sévère avec un taux de transaminases et de gamma GT généralement très élevés [56, 57]. La biopsie hépatique montre dans ces cas, une activité fibrosante plus intense notamment chez les personnes présentant des co-facteurs de risques mais l'activité hépatique reste relativement normale [58, 59]. La figure 4 représente les caractéristiques sérologiques de l'hépatite C chronique.

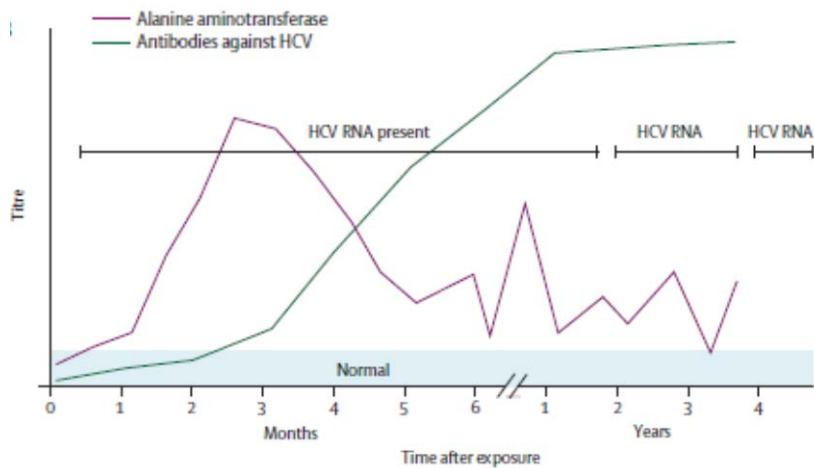


Figure 4 : Caractéristiques sérologiques de l'hépatite C chronique. En cas de progression de l'hépatite aiguë vers la chronicité on observe un taux d'anticorps anti-VHC élevé, la persistance d'ARN viral dans le sang et un taux d'ALAT qui fluctue et peut quelques fois devenir indétectable. Cette progression peut se faire de façon silencieuse et ce, pendant plusieurs années. *D'après Mushahwar, I.K., et al., Am J Clin Pathol, 1981.*

L'hépatite C chronique est le plus souvent asymptomatique mais peut s'accompagner d'une asthénie, d'une stéatose, et dans certains cas, de manifestations extra-hépatiques telles qu'une cryoglobulinémie mixte, une néphropathie ou une pathologie thyroïdienne [60]. Elle peut se caractériser par des lésions histologiques hépatiques modérées ou sévères pouvant générer des fibroses. Par ailleurs, des études génétiques ont mis en évidence chez l'hôte des polymorphismes génétiques susceptibles d'influencer l'évolution de la chronicité vers la fibrose tels que le polymorphisme du TLR-4 (Toll-like receptor 4) et PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) [61, 62]. L'aggravation de la fibrose reste difficile à évaluer en raison de la difficulté à répéter les biopsies hépatiques.

5.4- Fibrose et Cirrhose virale C

La fibrose hépatique est la conséquence évolutive d'une activité nécrotique et inflammatoire. Les espaces portes fibreux sont élargis, d'aspect étoilé et l'accumulation progressive du collagène dans les espaces péri-sinusoïdaux entraîne la formation de septa (ponts fibreux) entre deux espaces portes ou entre les espaces portes et les veines centro-lobulaires. Lorsque cette fibrose devient annulaire c'est-à-dire lorsqu'elle entoure complètement les nodules hépatocytaires, on parle de cirrhose [63]. Le taux de progression peut-être évalué en fonction de différents scores histologiques (METAVIR) [64]. Le tableau 2 représente la classification des stades de fibrose en fonction du score de METAVIR.

Stade de Fibrose (F)	Caractéristiques
F0	Absence de fibrose
F1	Fibrose portale sans septa
F2	Fibrose portale avec quelques septa
F3	Fibrose septale sans cirrhose
F4	Cirrhose

Tableau 2 : Score de METAVIR représentant les modifications architecturales permettant l'évaluation quantitative des cinq stades de la fibrose (F0 à F4). Le stade F0 se caractérise par ne absence totale de fibrose tandis que le F4 représente le stade de fibrose le plus avancé à savoir la cirrhose. *D'après Laurissa Ouaguia, 2015.*

La cirrhose hépatique induite après infection par le VHC peut rester silencieuse pendant plusieurs années. On estime qu'environ 15-20% des patients chroniques développent une cirrhose virale C. En effet, l'hépatite C chronique peut progresser au fil des décennies jusqu'au stade de cirrhose et cette progression est influencée par le sexe, l'âge, les co-infections et consommation d'alcool [65]. Le pronostic de la cirrhose repose sur 5 critères biologiques et cliniques que sont la bilirubine totale, le taux d'albumine, de prothrombine, les ascites et l'encéphalopathie hépatique. La gravité de la maladie hépatique chronique et cirrhotique est généralement évaluée grâce aux scores de Child-Turcotte-Pugh et MELD qui sont les plus utilisés [66, 67]. La cirrhose virale C est généralement découverte lors des biopsies hépatiques ou diagnostiquée au stade de carcinome hépatocellulaire. Elle se caractérise le plus souvent par une hypertension portale et par une insuffisance hépatocellulaire d'où l'appellation de « cirrhose décompensée ». La cirrhose décompensée résultant de l'hépatite C chronique est la première cause de transplantation hépatique en Europe et la deuxième en France après la cirrhose alcoolique [16, 68]. Une fois la cirrhose établie, le carcinome hépatocellulaire se développe avec un taux annuel de 1 à 4% [38, 69]. Des facteurs supplémentaires comme l'origine ethnique noire, les taux de plaquettes et de phosphatase alcaline, le tabac et la présence de varices sont associés à un risque de CHC chez les patients cirrhotiques.

5.5- Carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire est une complication tardive de l'hépatite C chronique survenant chez 1 à 5% des patients [37]. Le CHC représente la troisième cause de décès par cancers dans le monde [70, 71]. Dans le monde, environ 700 000 nouveaux cas de CHC sont découverts chaque année et plus de 20 % seraient dus au VHC. Selon les données épidémiologiques issues des bases GLOBOCAN 2012 de l'Agence Internationale de Recherche sur le cancer et des registres de mortalité de l'Organisation Mondiale de la Santé [72, 73], le CHC représenterait la cinquième cause de cancer dans le monde chez l'homme et la septième chez la femme [20]. Des prédictions mathématiques postulent qu'en 2015, environ 846582 personnes seront atteintes par le CHC montrant ainsi une progression de l'incidence du CHC au fil des années [72]. Les incidences les plus élevées de CHC sont observées dans les régions où la prévalence des infections virales C et B est accrue. Ainsi, plus de 80% des CHC surviennent dans les pays en voies de développement [74, 75]. Le CHC est une tumeur de mauvais pronostic caractérisée par une altération profonde de la fonction hépatique. La survie médiane des patients souffrant de CHC est inférieure à 1 an [76]. La figure 5 représente le nombre de décès par maladie chronique hépatique dans le monde.

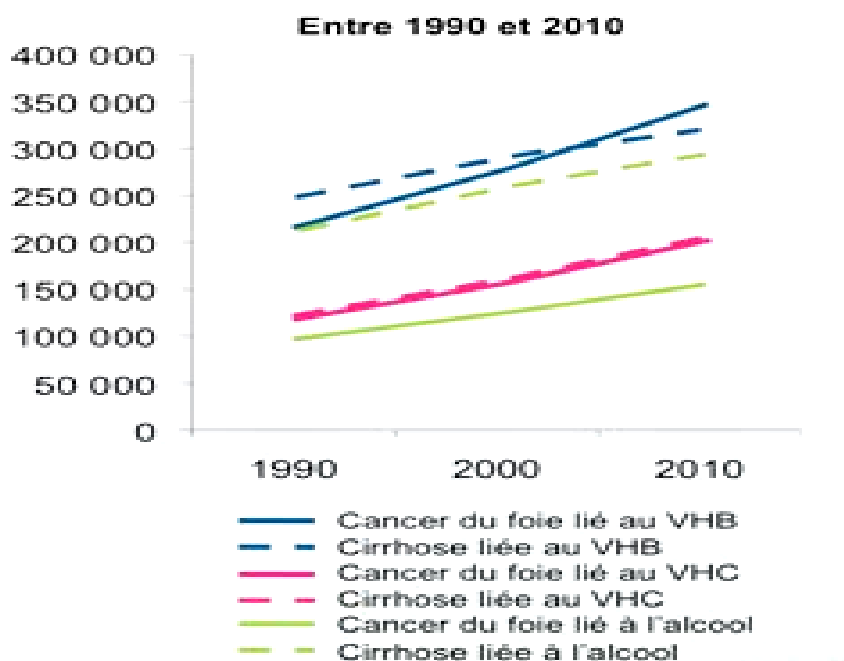


Figure 5 : Cause et nombre de décès par maladie chronique hépatique dans le monde en 2010. Entre 1990 et 2010. L'infection par le VHC représentait la troisième indication du développement de cirrhose du foie (*ligne hachurée rose*) et la deuxième cause du développement de cancer du foie (*ligne rose pleine*). Adapté de Cowie BC et al, AASLD 2013, abstract 23.

Dans la majorité des cas, le CHC se développe après des décennies d'hépatite chronique, induisant l'accumulation progressive de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques, ce qui aboutit à la transformation maligne des cellules du foie. Contrairement au VHB, le VHC ne s'intègre pas au génome de l'hôte. Ainsi, le CHC induit par le VHC se fait essentiellement par des mécanismes indirects tels que l'inflammation chronique induite et *via* les phénomènes de mort/survie cellulaires induits [77]. L'hépatocarcinogénèse virale C touche plus particulièrement les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire et l'apoptose telle que la voie Wnt/béta-caténine, p53, pRb, MAPK, JAK/STAT, PI3K/Akt et celles des facteurs de croissance [78-80]. Il existe de plus en plus d'évidences montrant que le processus inflammatoire est lui-même intimement associé à l'hépatocarcinogénèse virale C, notamment par le biais des cytokines [81]. Cependant, certaines études ont montré que les protéines virales (Core) pouvaient favoriser l'hépatocarcinogénèse virale C [82]. De nos jours, le pronostic du CHC reste négatif car la plupart des sujets ne sont pas traités (accès aux soins limité dans les pays émergents) ou ne sont pas traitables (insuffisance hépatique limitant les thérapies). Néanmoins, traités à une phase précoce, des survies prolongées de patients peuvent être obtenues. La meilleure prévention de ce cancer reste donc le traitement précoce du VHC. La figure 6 représente les étapes du développement du carcinome hépatocellulaire après infection par le virus de l'hépatite C.

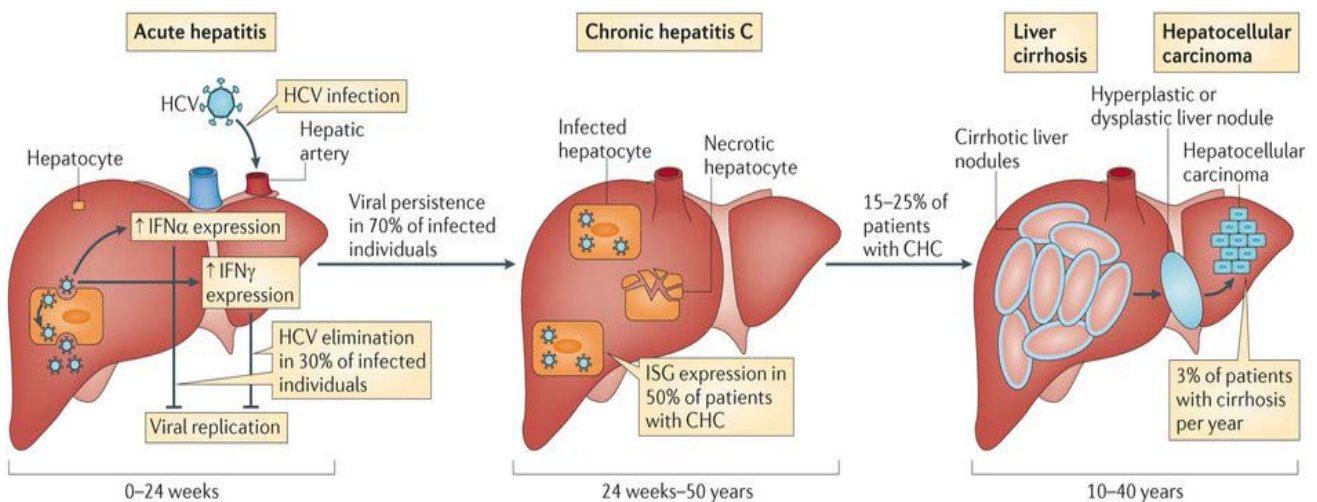


Figure 6 : Progression de l'hépatocarcinogénèse virale C. L'infection par le VHC déclenche la réponse inflammatoire anti-virale (IFN- γ) au cours de la phase aiguë. Dans 70% des cas, cette réponse est inefficace et la maladie devient chronique. Cette chronicité est caractérisée par la persistance du virus dans le foie et le développement de nodules nécrotiques. Il y a alors développement d'une cirrhose qui peut progresser vers le développement d'un carcinome hépatocellulaire. *D'après Markus H Heim, Nature Reviews immunology 2013.*

5.6- Manifestations extra-hépatiques

De nombreuses manifestations extra-hépatiques liées à l'infection par le virus de l'hépatite C ont été décrites. La pathologie la mieux décrite comme étant une conséquence de l'hépatite C est la cryoglobulinémie mixte associée une prolifération lymphocytaire B [83]. Il a également été décrit un lien clair entre l'hépatite C et la survenue de glomérulonéphrite et lymphomes non hodgkiniens [84]. Certaines manifestations telles que la thyroïdite auto-immune, le purpura thrombopénique idiopathique, le syndrome de Sjögren, le diabète, l'insulinorésistance et la péri-artérite semblent également plus fréquentes chez les patients chroniquement infectés par le VHC [85]. Plus récemment, les symptômes neuropsychiatriques telles que l'asthénie, troubles de la mémoire, troubles du sommeil et dépression ont également été associés à l'infection par le VHC. Ces manifestations psychiatriques sont observées dans environ 6% des cas [86]. Le tableau 3 résume l'ensemble des manifestations extra- hépatiques les plus couramment associées à l'hépatite C.

Manifestations extra-hépatiques associées l'infection par le virus de l'hépatite C

Cryoglobulinémie mixte

Lymphomes non hodgkiniens

Péri-artérite

Glomérulonéphrites

Neuropathies (troubles psychiatriques)

Désordres lympho-prolifératifs

Porphyrie

Thyroïdite auto-immune

Syndrome de Sjögren

Tableau 3 : Manifestations extra-hépatiques fréquemment associées à l'hépatite C. *D'après Laurissa Ouaguia, 2015.*

5.7- Persistance virale C et récidive

Le foie est un organe qui contient de nombreuses cellules telles que les hépatocytes, les fibroblastes intra-hépatiques, les phagocytes, les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales, les cellules étoilées de l'espace de Disse, les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes [87]. C'est aussi un site de production importante de cytokines (IFN- γ , IL-10), de chimiokines, de composants du complément et de protéines de l'inflammation. Ces différents facteurs jouent un rôle important dans la migration et le recrutement ou « homing » des cellules inflammatoires effectrices ou régulatrices de l'immunité. En conséquence, les antigènes sont présentés aux lymphocytes dans un contexte cytokinique hautement immunosuppresseur, ce qui favorise un état de tolérance immunitaire que certains pathogènes comme le VHC exploite pour établir leur persistance [88-90]. En outre, la variabilité génétique du VHC est une cause essentielle de persistance et de la récidive virale. En effet, plus de 10^{12} virions sont générés chaque jour [91]. Ce niveau élevé de réplication associé à une absence de correction des erreurs de transcription aboutit à l'émergence de nombreux variants constituant la quasi-espèce. Ce phénomène favoriserait l'échappement du virus à la réponse immunitaire humorale ou cellulaire. De plus, la pression de sélection accentue le phénomène d'adaptation des nouveaux variants pour réinfecter l'individu. En outre, des mutations peuvent apparaître au niveau des séquences en acides aminés de certains épitopes du VHC, favorisant alors la persistance virale [92]. Enfin, par son architecture particulière, les cellules du foie sont intimement liées les unes aux autres et la transmission cellules à cellules peut permettre au virus d'échapper aux réponses immunitaires, en l'occurrence aux anticorps neutralisants [93].

6- Diagnostic clinique et virologique

Les méthodes couramment utilisées pour diagnostiquer l'hépatite C sont la recherche des anticorps anti-VHC de séroconversion et la détection de l'ARN viral par PCR. En effet, la présence d'anticorps témoigne d'un contact antérieur avec le virus. Pour ce faire, les professionnels de santé utilisent des RDTs (tests rapides de diagnostic), des POCTs (point-of-care tests) et des tests ELISA de 3^{ème} génération (Recombinant Immunoblot Assay) qui ont une sensibilité et une spécificité supérieures à 97 %. En effet, les anticorps anti-VHC sont sécrétés vers le 3^{ème} mois suivant la contamination [40, 41] et chez un patient ayant une sérologie de l'hépatite C positive, il convient de rechercher l'ARN du VHC. Pour ce faire, différentes techniques sont utilisées. La première utilise l'ADN ramifié (branched DNA) qui permet d'amplifier et de quantifier la charge virale du patient. Cette technique s'appuie sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'ARN viral suivie d'une amplification du signal par branchement d'ADN sur la sonde hybridée. Ce test est peu

sensible car il ne détecte la charge virale qu'à partir de 500 UI/ml. La deuxième technique est le diagnostic par TMA (Transcription Mediated Amplification). Il s'agit d'un procédé d'amplification de l'ARN viral par deux enzymes, la transcriptase inverse et la T7 RNA-polymérase en utilisant deux amorces dont l'une contient le promoteur T7 nécessaire à la transcription. Cette technique très sensible permet la détection de charges virales comprises entre 5 à 10 UI/ml. La troisième technique, de loin la plus utilisée, repose sur la transcription inverse de l'ARN messenger suivie d'une amplification en chaîne de la polymérase (RT-PCR). Cette méthode permet d'obtenir des informations quantitatives et qualitatives sur la charge virale des patients [94]. Généralement, une PCR positive signifie que l'infection est chronique. Dès lors, il faut rechercher le génotype viral impliqué. La détermination du génotype repose sur l'utilisation de bandelettes de nitrocellulose (INNO-Line Probe Assay) chargées en sondes spécifiques de l'ensemble des génotypes. Enfin, le diagnostic clinique peut aussi être évalué sur la base de tests sérologiques (recherche de cryoglobulinémie mixte). En effet, plusieurs études montrent que la réponse au traitement est fortement influencée par la charge virale et encore plus par le génotype du virus de l'hépatite C.

B/ LE VIRUS DE L'HEPATITE C

1- Découverte du virus de l'hépatite C

En 1975, les scientifiques prennent connaissance de l'existence d'un nouveau pathogène responsable d'hépatites non-A, non-B [3, 5]. Au milieu des années 80s, des études montrent que les chimpanzés infectés avec du plasma des patients NANB développent une maladie hépatique identique à celle de l'homme et cette maladie semble d'origine virale. En mai 1988, l'identification du clone viral de l'agent étiologique de l'hépatite NANB est décrite par Houghton et ses collaborateurs de la Chiron Corporation grâce à l'élaboration d'une banque d'ADN complémentaires à partir du matériel génétique d'inoculum de chimpanzé avec un fort pouvoir infectieux [95, 96]. Ainsi, le clone viral 5-1-1 codant pour un épitope immuno-dominant situé à l'intérieur de la protéine non structurale NS4 du VHC est mis en évidence comme étant spécifique des échantillons NANB. En 1989, le virus NANB est identifié par Choo et ses collaborateurs qui, après l'avoir séquencé, l'ont renommé virus de l'hépatite C (VHC) [7]. Malgré l'incapacité d'effectuer des expériences de virologie moléculaires classiques, l'origine virale du VHC est démontrée grâce à son hybridation spécifique avec une grande molécule d'ARN simple brin d'environ 10 000 nucléotides. En effet, cet ARN simple brin a été retrouvé uniquement dans les échantillons positifs NANB. Par ailleurs, des études approfondies révèlent que la séquence virale est nouvelle car très différentes de celle des autres flavivirus [7]. L'ensemble du génome viral cloné et comparé aux autres séquences connues a permis de rapprocher le VHC aux membres de la famille des *Flaviviridae*, dans un nouveau genre, exclusivement réservé à ses variants, le genre *Hépacivirus* [97]. Dès 1991, de premières études mettent en évidence la polarité positive de cet ARN viral [98]. Et de nos jours, le VHC est défini comme un virus à ARN simple brin de polarité positive, d'environ 9.6 kb, contenant un large cadre ouvert de lecture bordé de régions 5' et 3' non traduites. Ces découvertes majeures ont permis de mettre sur pied la première génération de tests sanguins de dépistage systématique des anticorps anti-VHC sur les dons de sang ce qui a fortement diminué le risque d'hépatites post-transfusions (préalablement estimé à 10%) [99]. Ces dernières années, une recherche très active a permis non seulement de comprendre la structure du virus, son génome, son entrée et la fonction de ses protéines virales mais également de mieux appréhender les mécanismes de variabilité génétique, de tropisme cellulaire et de réplication adaptative. La figure 7 est une représentation schématique de la découverte et de l'identification du virus de l'hépatite C à partir des chimpanzés infectés avec les plasmas des patients NANB.

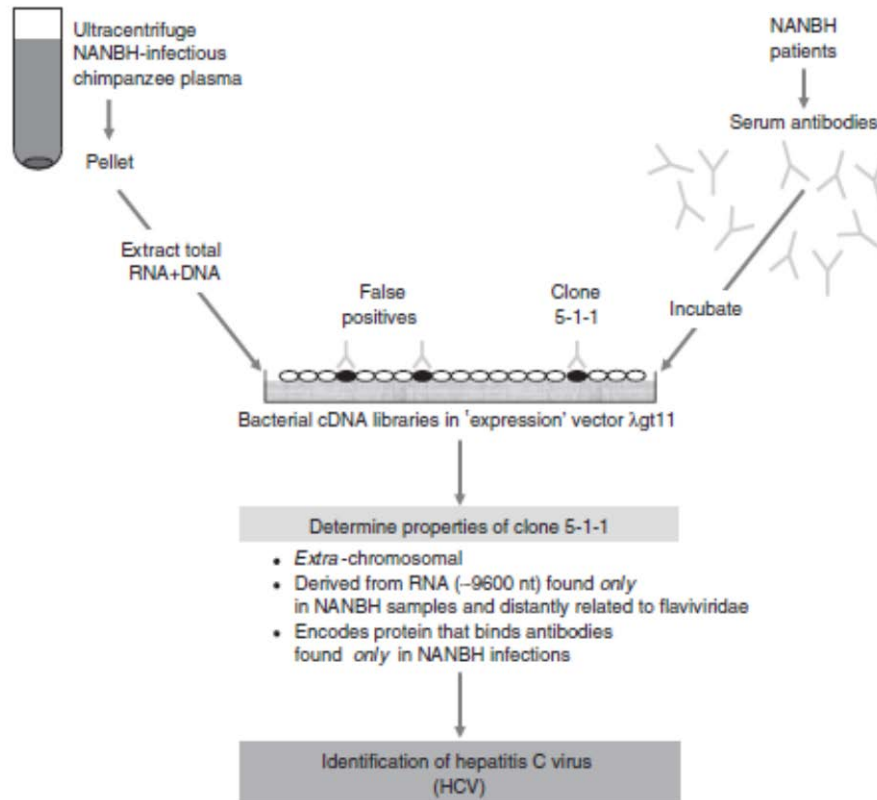


Figure 7 : Histoire de l'identification et la découverte moléculaire du virus de l'hépatite C. Des chimpanzés ont été infectés avec le plasma de patients porteurs d'hépatites NANB. Après le développement d'une maladie identique à celle de l'homme, le plasma de ces chimpanzés a été récupéré puis le matériel nucléique total a été purifié par ultracentrifugation. En parallèle, a été récupéré le sérum de patients NANB possédant des niveaux élevés d'ALAT (signe de dommage sévère au foie). L'utilisation de banque d'ADNc a mis en évidence le clone 5-1-1 comme spécifique du génome viral NANB. Ce virus NANB a ensuite été appelé VHC. *D'après Choo, QL et al, Science 1989 ; Houghton M, Liver International 2009.*

2- Structure du virus de l'hépatite C

Le VHC, comme tous les autres membres de la famille des *Flaviviridae*, se caractérise par un génome d'ARN viral, une nucléocapside icosaédrique et une enveloppe lipidique (voir figure 8) [100]. Le génome du VHC est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 9600 nucléotides. Son enveloppe est une nucléocapside icosaédrique de 30 à 60 nm de diamètre elle-même enveloppée d'une double couche lipidique, provenant fort probablement du réticulum endoplasmique et dans la quelle sont ancrées des glycoprotéines d'enveloppe [101]. Des particules virales provenant de tissus de foie et de sérums de patients infectés par le VHC ont pu être visualisées directement par microscopie électronique [102, 103]. Ainsi, des nucléocapsides non enveloppées ont également été observées à partir de certains sérums de patients infectés. Le VHC présente donc une certaine hétérogénéité car son diamètre peut varier entre 38 à 65 nm [104]. La figure 8 est une représentation du virus de l'hépatite C.

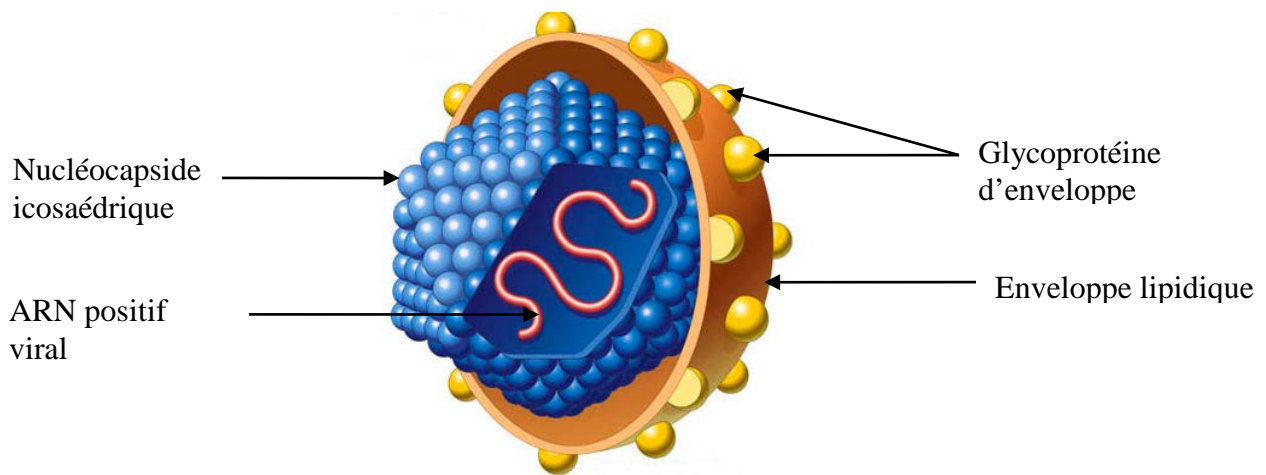


Figure 8 : Structure du virus de l'hépatite C. Le génome viral (ARN) est entouré par une nucléocapside icosaédrique elle-même enveloppée par une double couche lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. *Adapté de J. Perkins, The scientist, 2006.*

Le génome du VHC renferme un large cadre ouvert de lecture (ORF : open reading frame) codant pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés qui est organisée comme suit : NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Cette polyprotéine donnera après clivages co- et post- traductionnels 3 protéines structurales E1, E2 et Core, une protéine p7 (non classée) et 6 protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. Occasionnellement, une protéine F (F/ARFP) issue d'un cadre de lecture alternatif localisé dans la séquence de la protéine Core peut également être générée [105]. L'ORF est bordé en 5' et 3' de régions non traduites (UTR : untranslated regions) d'approximativement 340 et 230 nucléotides respectivement [106]. La figure 9 représente l'organisation générale du génome du virus de l'hépatite C.

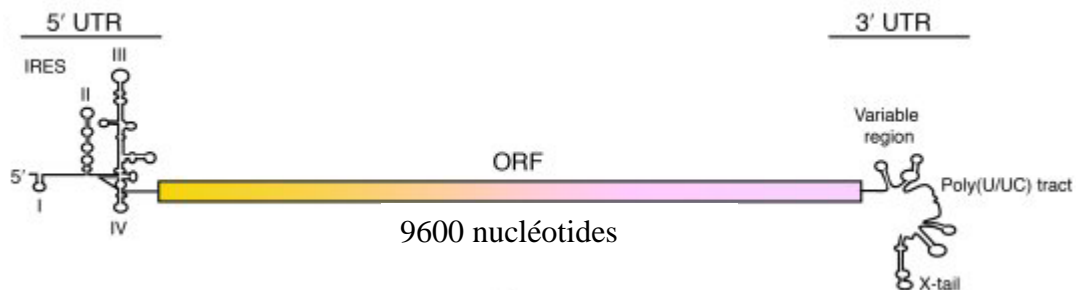


Figure 9: Organisation du génome du virus de l'hépatite C. L'ARN positif simple brin du génome viral est constitué d'un large cadre ouvert de lecture (ORF) flanqué de deux extrémité 5' et 3' non traduites. Ce génome possède le signal pour initier et coordonner la synthèse des protéines virales et la répllication. La translation est initiée au niveau de l'IRES dans la région 5' UTR. *Adapté de Barbara Rehmann, Nature reviews Immunology 2009.*

2.1- Les régions non codantes 3' et 5'

Les extrémités non codante et non traduites (UTR) du VHC jouent un rôle important dans la réorganisation du génome viral, la réplication, l'initiation de la traduction et l'assemblage viral [107].

2.1.1- L'extrémité 3' non codante

L'extrémité 3' non traduite du VHC est structurellement divisée en trois domaines distincts. De 5' vers 3' : une région constituée de 40 nucléotides variables selon les isolats et formant deux structures tiges-boucles, une queue poly(U)- poly (U/UC) de longueur comprise entre 30 à 150 nucléotides et une région très conservée de 98 nucléotides appelée région X qui forme trois structures tiges-boucles, cette dernière région étant la plus stable [108]. L'extrémité 3' UTR joue un rôle important dans l'initiation et la régulation de la réplication virale et semble impliquée dans la synthèse de l'ARN de polarité négative. En effet, les 3 domaines de cette extrémité interviennent dans la réplication du brin négatif du VHC [109, 110]. Par ailleurs, grâce à l'utilisation de constructions cistron-rapporteurs, plusieurs travaux ont montré que l'extrémité 3' UTR pouvait également stimuler la traduction IRES-dépendante [111].

2.1.2- L'extrémité 5' non codante

L'extrémité non traduite 5' possède une séquence nucléotidique d'environ 340 nucléotides dépourvue de coiffe méthylée qui possède la particularité d'être très conservée chez tous les génotypes du VHC [110, 112]. L'extrémité 5' est composée de 4 domaines distincts. De 5' vers 3' : un repli en épingle à cheveux constitué de 27 nucléotides formant le domaine I et les domaines II, III et en tiges-boucles comprenant 3 à 5 codons initiateurs. Le domaine III de l'extrémité 5' représente le domaine le plus large tandis que le domaine IV forme un pseudo-nœud au niveau du codon start AUG. Des études récentes ont montré que cette extrémité 5' possède deux sites de fixation pour un petit ARN non codant mir122 [113]. Cette fixation du mir122 à l'extrémité 5' favorise la traduction de la polyprotéine et stimule la réplication du génome viral [114, 115]. De plus mir122 semble favoriser la l'infectivité des virions, favorisant ainsi la pathogenèse virale C [116]. L'extrémité 5' contient également plusieurs codons AUG (de 3 à 6 selon le génotype) dont 2 aux positions nucléotidiques 85 et 215, très conservés entre le VHC et les pestivirus. Par ailleurs, l'extrémité 5' fonctionne comme un site interne d'entrée pour le ribosome. En effet, l'extrémité 5' UTR est composée d'un IRES « internal ribosome entry site » qui recrute directement la petite sous-unité 40S du ribosome, initiant ainsi la traduction de la polyprotéine [117]. Ainsi, la fonction majeure de la région 5' non traduite est l'IRES qui englobe les domaines II, III et IV[110]. Cet

IRES participe à l'initiation de la traduction de la polyprotéine virale et à la réplication grâce à un mécanisme coiffe-indépendante.

Structure de l'IRES du VHC

L'IRES du VHC est constituée de 3 des 4 domaines de l'extrémité 5'UTR et elle contrôle la traduction de la polyprotéine virale [118]. L'IRES est la région la plus conservée entre les différents génotypes du VHC ce qui fait d'elle une cible de choix pour un traitement spécifique [119]. L'ARN de l'IRES VHC possède une séquence primaire hautement conservée et une structure secondaire composée de 4 domaines I, II, III et IV. Néanmoins, ce sont bien les domaines II, III et IV qui sont impliqués dans la machinerie de traduction. L'IRES du VHC peut adopter une conformation 3D caractéristique ou une structure tertiaire spécifique en fonction des concentrations physiologiques d'ions. Or, la conservation de la structure IRES détermine l'efficacité de la synthèse de la protéine virale [120]. La figure 10 représente la structure secondaire de l'IRES du virus de l'hépatite C (IRES VHC).

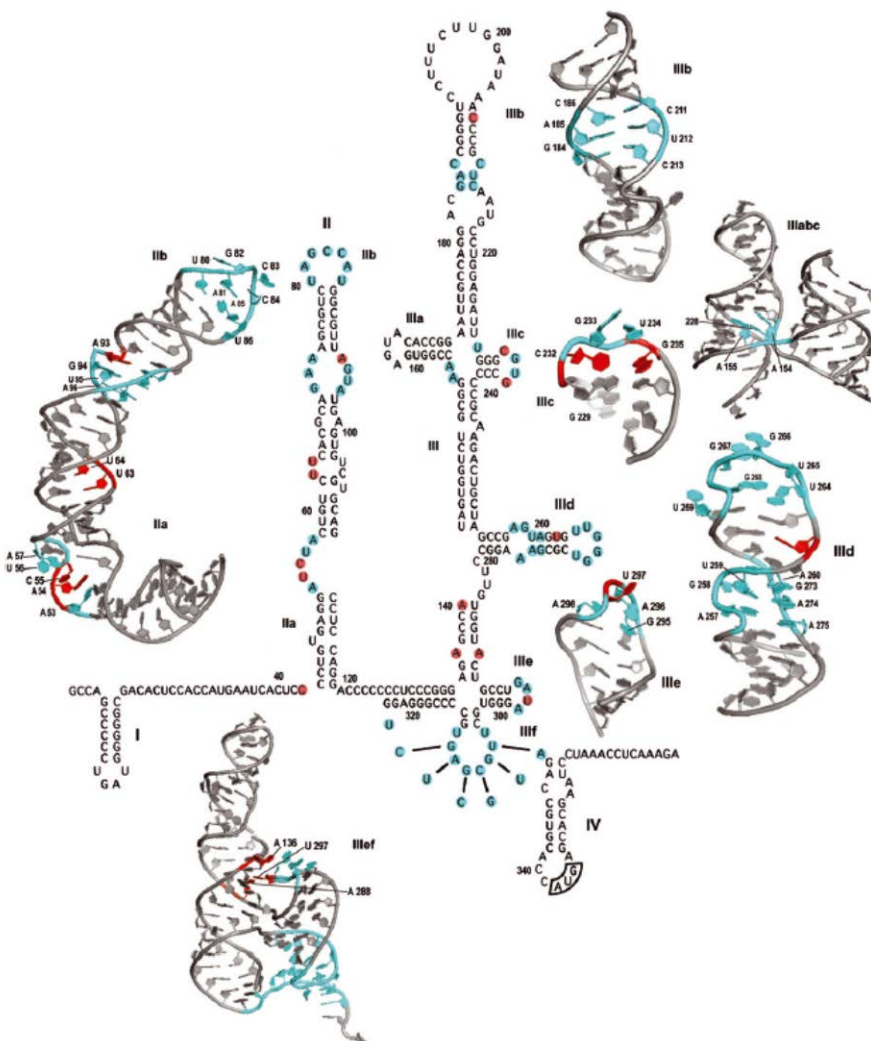


Figure 10 : Structure secondaire et Représentation 3D de l'IRES VHC. Les différents domaines de l'IRES sont annotés à côté des séquences respectives. La représentation 3D des sous-domaines II (à gauche) et III (à droite et en bas) a été obtenue par résonance magnétique nucléaire et par cristallographie. Les nucléotides colorés en Cyan indiquent les régions hautement conservées tandis que ceux colorés en Rouge indiquent celles impliquées dans les mutations décrites de l'IRES. D'après Anas Khawaja, *WIREs RNA* 2015.

Contrairement au processus d'initiation de la traduction des ARN messagers chez les eucaryotes, l'IRES du VHC recrute et positionne directement les sous-unités ribosomales 40s sur le codon start AUG sans intervention des facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction (eIFs) [119]. Ce positionnement est suivi de la fixation de facteurs de traduction eIF3 et eIF2-GTP-Met-tRNA qui stabiliseront la pré-initiation de la traduction [121]. Enfin, les facteurs eIFs sont relargués permettant alors la fixation de la sous unité 60s pour la formation d'un ribosome 80s qui initie la synthèse protéique. Ainsi, l'IRES permet la traduction coiffe indépendante de l'ARN viral par les ribosomes cellulaires qui interagissent principalement avec le domaine III de l'IRES. Néanmoins, tous les domaines de l'IRES (II, III et IV) se sont révélés nécessaire à la réplication du génome viral. La figure 11 résume le fonctionnement de l'IRES VHC dans l'initiation de la traduction.

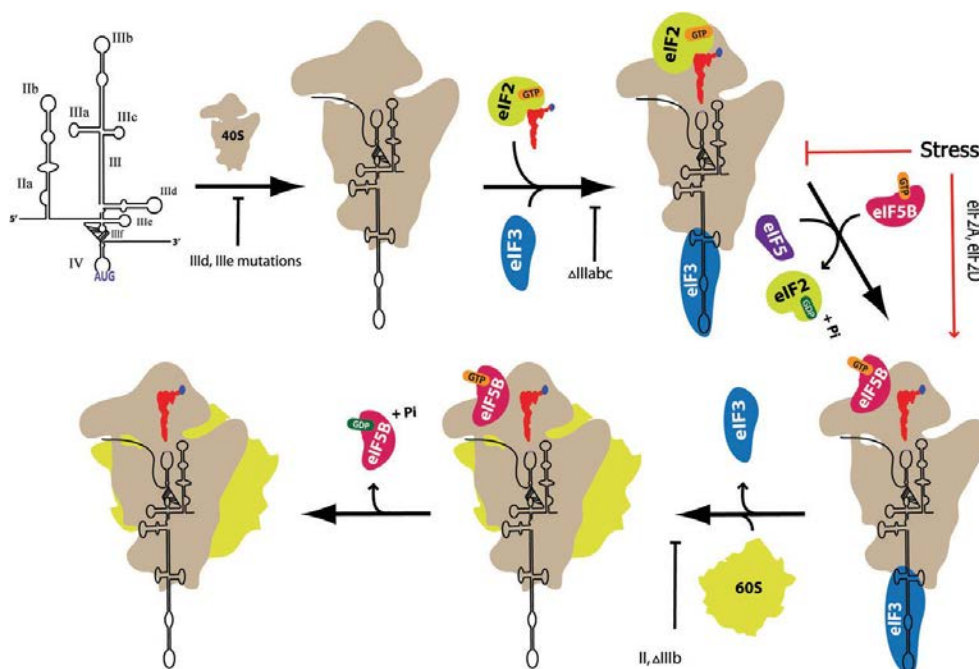


Figure 11 : Fonctionnement de l'IRES VHC dans l'initiation de la traduction. L'arrangement des domaines de l'IRES du VHC avec les sous-unités ribosomales nécessite l'assemblage des complexes de pré-initiation de la traduction 40s et 80s. L'IRES se fixe directement à la sous unité 40s puis différents facteurs de traduction eIFs sont recrutés. Par la suite, la sous-unité 60s est recrutée pour la formation de l'unité ribosomale 80s qui initie la traduction. Des mutations dans différents domaines de l'IRES VHC peuvent inhiber la formation des complexes de traduction. D'après Anas Khawaja, *WIREs RNA* 2015.

2.2- Les régions codant les protéines virales

La traduction IRES dépendante de l'ORF génère au niveau du réticulum endoplasmique une polyprotéine précurseur de 3008 à 3037 acides aminés[122]. Ce génome viral est similaire à celui des pestivirus et flavivirus. La polyprotéine précurseur, organisée comme suit NH₂-C-E1-E2-p7-

NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH, subira des modifications co- et post-traductionnelles. Cette polyprotéine peut être subdivisée en 2 régions : le premier tiers à l'extrémité amine (N-terminale) codant pour les composantes structurales et les deux tiers restants codant pour les protéines non structurales (C-terminale). Les protéines non structurales sont séparées des protéines structurales par un petit polypeptide hydrophobe. Dans un premier temps, la polyprotéine est clivée par les peptidases-signal cellulaires (SPP) de l'hôte entre les jonctions C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2 pour donner les 3 protéines structurales E1, E2, Core et la protéine p7. Ensuite, l'auto-protéase virale NS2 clive la jonction NS2/NS3. Enfin, la sérine protéase virale NS3-4A clive le reste de la polyprotéine virale pour donner les 6 protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. Ces clivages s'opèrent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, lieu où ces protéines seront localisées. Les protéines virales résultantes ont chacune des fonctions spécifiques qui seront discutées dans les chapitres suivants. La figure 12 montre le clivage de la polyprotéine par les protéases cellulaires et virales.

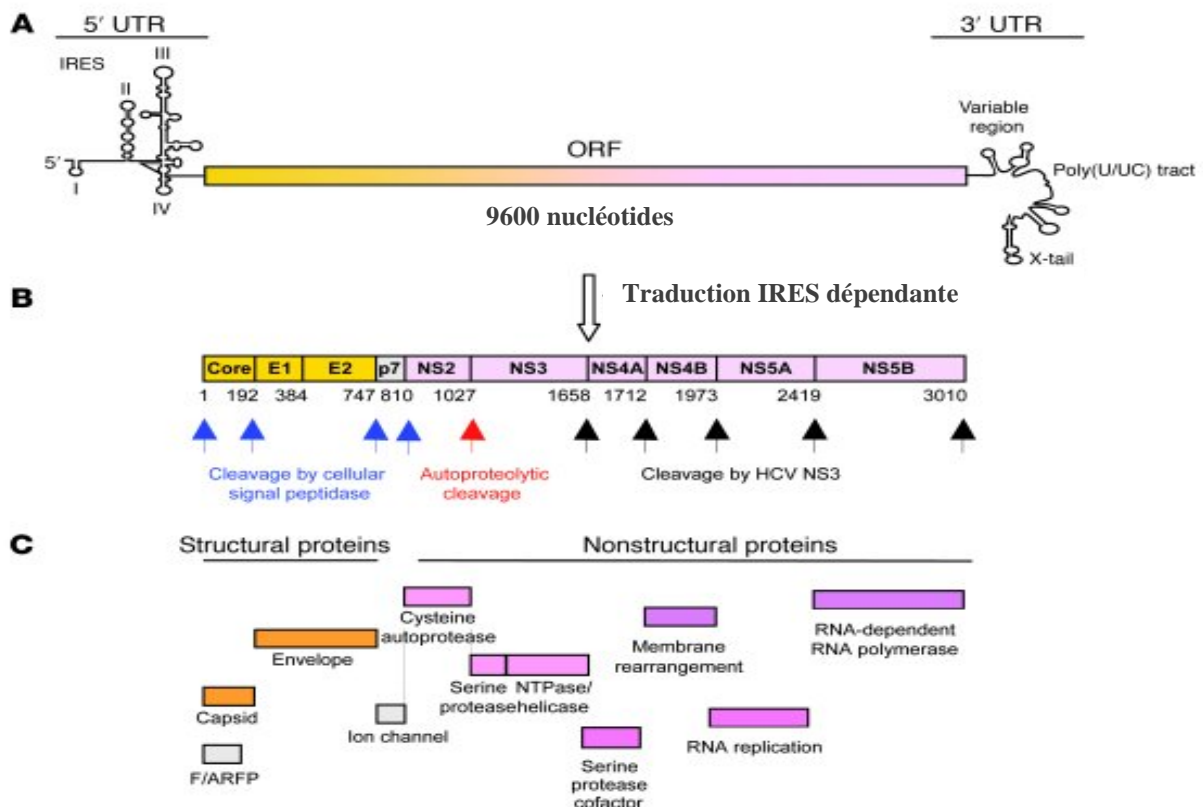


Figure 12 : Organisation du génome du virus de l'hépatite C. (A) L'ARN positif simple brin du génome viral est constitué d'un large cadre ouvert de lecture (ORF) bordé de deux extrémités 5' et 3' non traduites. (B) Expression de la polyprotéine qui subira des clivages co- et post-traductionnels. Les protéines structurales (en jaunes) sont clivées par des peptidases-signal cellulaires (flèches violettes), alors que les protéines non structurales (en rose) sont libérées par des protéases virales (flèches rouge et noires). Le polypeptide non classé p7 est coloré en gris. Les chiffres placés en dessous de la polyprotéine indiquent en acides aminés la position à laquelle les clivages ont lieu. (C) Fonction des 10 protéines virales résultantes. Une protéine F additionnelle (F/ARFP), en gris, peut également être traduite à partir d'un cadre de lecture alternatif se trouvant sur la séquence de la capsid. Adapté de Barbara Rehermann, *Nature Reviews Immunology* 2009.

2.2.1- Les protéines structurales

Dans un premier temps, la polyprotéine du VHC est clivée pour donner 3 protéines structurales que sont : la protéine de la capsidite et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 [117].

a- La protéine de la capsidite

La protéine de la capsidite est située à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine virale. Elle est clivée par les peptidases-signal cellulaires (SPP) (voir figure 12). Le constituant majeur de cette nucléocapsidite virale est la protéine Core. Comparée aux autres protéines structurales et non structurales, la séquence nucléotidique de la protéine Core est très conservée chez les différents variants du VHC. Des études montrent des interactions existent entre la protéine Core et la région 5' UTR de l'ARN viral, ce qui suggère son implication dans le contrôle de la réplication virale, de la traduction et de l'encapsidation [101]. A la base, la protéine Core a une taille de 21kD et n'est pas glycosilée. Cependant, différentes études ont mis en évidence des protéines Core glycosilées pour certaines, et dont les tailles varient entre 16-23kDa [123-127]. Aujourd'hui, la protéine Core est définie comme une phosphoprotéine de 23kDa libérée dans le RE mais qui mature en une protéine de 21kDa, ce qui lui permet d'être transportée vers les gouttelettes lipidiques, site d'assemblage des particules virales. La localisation de la protéine Core est donc principalement cytoplasmique mais quelques études révèlent aussi une localisation mitochondriale ou nucléaire de la forme courte (19kDa) [126, 128]. La région hydrophobe C-terminale de Core représente le domaine transmembranaire qui lie la capsidite à la membrane du RE. La protéine Core forme des homodimères et des hétérodimères avec la glycoprotéine d'enveloppe E1, importante dans l'assemblage des virions [129]. En plus de cette fonction structurale, la protéine Core peut moduler plusieurs processus cellulaires impliqués dans la pathogenèse virale en interférant directement avec les processus biologiques: apoptose, formation des gouttelettes lipidiques et de la stéatose, formation des ROS (reactive oxygen species), voies de signalisation, activation transcriptionnelle modifiant l'expression de certains gènes et hépato-carcinogenèse virale C [82]. En effet, par ses interactions avec l'apolipoprotéine AII, avec le récepteur au TNF (TNFR) et le récepteur à la lymphotoxine bêta (LTbR), la protéine Core favorise le développement de la stéatose hépatique et le carcinome hépatocellulaire [82, 130, 131]. Par ailleurs, la protéine Core est également impliquée dans l'activation de SOCS (suppressor of cytokine signaling) responsables d'une diminution de l'IRS-1 (insulin receptor substrate-1), à l'origine de l'insulino-résistance liée au virus. En outre, la protéine Core possède une activité immunosuppressive car elle inhibe la prolifération des cellules immunitaires activées grâce à des interactions avec le récepteur du complément gC1qR. Par ailleurs, elle induit l'apoptose des lymphocytes T *via* la voie Fas-FasL, favorise l'expansion et

l'activation des lymphocytes T CD4+ régulateurs et favorise la chronicité de l'infection virale [122,123][132]. De plus, la protéine Core semble favoriser le développement de la réponse inflammatoire Th17 en inhibant la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, en augmentant la sécrétion d'IL-6 (interleukine-6) et en favorisant la sécrétion de la TSLP (thymic stromal lymphopoietin) [133, 134].

Des auteurs ont suggéré que la protéine Core serait reconnue par le récepteur TLR-2 (toll-like receptor) et qu'elle serait capable d'activer, *in vitro*, les cellules inflammatoires du système immunitaire inné *via* la coopération du TLR-2 avec ses corécepteurs TLR-1 et TLR-6 [135]. La figure 13 présente les interactions entre la protéine Core et le récepteurs cellulaire TLR-2 et ses cofacteurs TLR-1 et TLR-2.

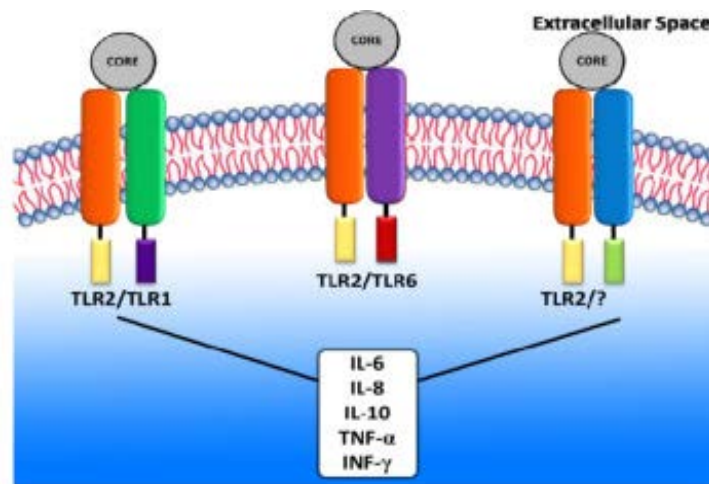


Figure 13 : Fixation de la protéine Core du VHC sur le récepteur TLR-2. La protéine Core du virus de l'hépatite C est reconnue à la surface cellulaire les complexes de récepteurs TLR-2/TLR-1 et TLR-2/TLR-6. Cette reconnaissance active la signalisation cellulaire et la sécrétion de facteurs cytokiniques tels que l'IL-6, l'IL-8, IL-10, le TNF- α et l'INF- γ . D'après Imran, M, *Virology journal*, 2012.

Les mécanismes de reconnaissance du virus s'accompagnent d'une augmentation de la production de TNF- α (tumor necrosis factor alpha) et d'IL-10 susceptibles de moduler la réponse immunitaire [135, 136]. La protéine Core peut se lier à plusieurs protéines suppresseurs de tumeurs telles p53, p73, pRb et moduler l'expression de la protéine p21/waf, kinase cycline-dépendante inhibitrice [137-140]. Par ailleurs, elle augmente l'expression du TGF- β (transforming growth factor beta) favorisant ainsi la fibrogenèse par les cellules étoilées du foie. De ce fait, elle joue un rôle essentiel dans la progression de la maladie vers la cirrhose [141]. La protéine Core participe aussi à la transformation cellulaire et au processus de cancérisation induit par le VHC. En effet, elle peut activer la voie beta-caténine, réprimer l'expression transcriptionnelle de l'E-cadhérine et

interagir avec Smad3, ce qui peut avoir des conséquences sur la croissance tumorale [142, 143]. De plus, la protéine Core peut inhiber l'activation du facteur IRF-3 (interferon regulatory gene 3), essentiel dans la réponse innée anti-virale [144]. La protéine Core est donc une protéine multifonctionnelle essentiellement impliquée dans la morphogénèse et la pathogénicité du VHC.

b- Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les protéines structurales E1 et E2 sont des glycoprotéines d'enveloppe respectivement de 31kDa et 70kDa. Ces glycoprotéines transmembranaires sont présentes à la surface du virus et sont liées à la double couche lipidique par des domaines hydrophobiques (voir figure 14). La maturation des protéines E1 et E2 est dirigée par des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique (calnexine), par les N-glycosidases et par les signalases cellulaires. Clivées par les peptidases-signal cellulaires, E1 et E2 possèdent respectivement 5 à 6 sites et 9 à 11 sites de N-glycosylation [127, 145]. Dans le réticulum endoplasmique (RE), E1 et E2 forment des hétérodimères avec Core et NS2 : ils sont alors appelés complexes pré-bourgeonnants (E1-E2-Core-NS2) [129]. Par la suite, E1 et E2 deviennent des protéines transmembranaires de type I accrochées à l'enveloppe virale [146]. La figure 14 représente la localisation des protéines du complexe de réplication viral.

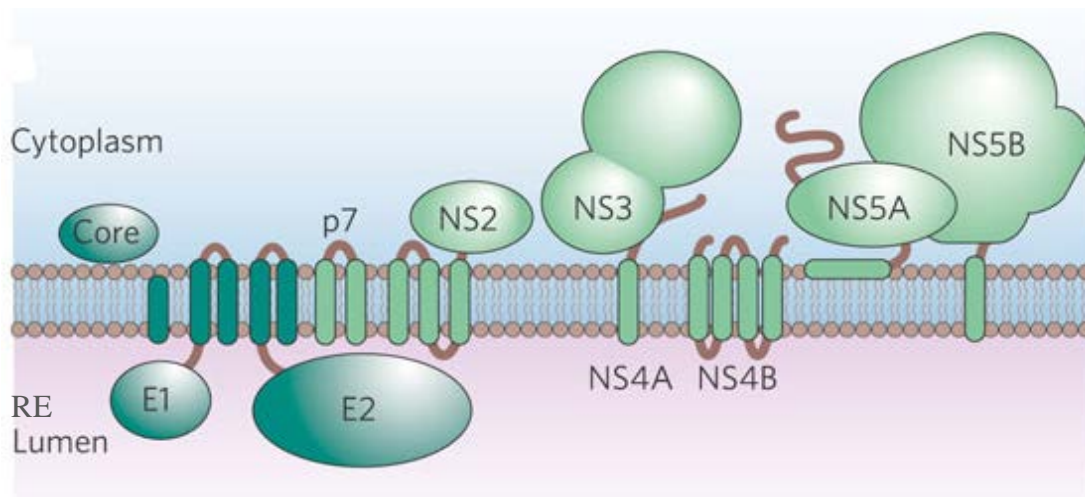


Figure 14 : Complexe de réplication du VHC. Au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) la polyprotéine de VHC subit des modifications co- et post-traductionnelles puis est clivée en 10 protéines virales Core, E1, E2, p7, NS2-NS5B. Les protéines résultantes sont ainsi, pour la plupart, transmembranaires et restent localisées au RE. *Adapté de Lindenbach et Rice, Nature 2005.*

Les glycoprotéines E1 et E2 sont principalement impliquées dans la morphogénèse des virions, dans l'attachement et dans l'entrée du virus dans les cellules hôtes par leurs interactions avec des récepteurs spécifiques [147-149]. Les interactions entre E1/E2 et les récepteurs sont par ailleurs essentielles à la stabilité et la maturation des protéines virales [150]. Des interactions précises ont, en effet, été décrites entre les protéines E1/ E2 et les récepteurs putatifs du VHC que sont le CD81, LDLR, SCARB-I, Claudine-1 et Occludine [149]. Par ailleurs, d'autres interactions glycoprotéines et récepteurs peuvent également exister (EGFR, DC-SIGN, ICAM-3, L-SIGN, TLR-2, etc.). Néanmoins, le rôle de ces interactions E1/E2-récepteurs dans la fusion des membranes au cours du processus d'entrée n'est pas encore bien défini [151]. Des études ont révélé que d'autres protéines cellulaires pourraient également être impliquées dans les processus complexes de maturation, de conformation et d'oligomérisation des glycoprotéines E1 et E2 tout comme dans le processus d'enveloppement des particules [152]. Par ailleurs, d'autres études montrent que E1 et E2 sont très importantes dans la morphogénèse et le relarguage des néovirions [145]. En outre, en interagissant avec les molécules de signalisation PKR (Protéine kinase ARN-dépendante), la protéine E2 peut inhiber les effets de l'interféron (IFN) [153]. Enfin, E2 semble aussi impliquée dans la désorganisation de la conformation du RE [154]. Ainsi, en plus d'être essentielle à l'entrée et à l'internalisation du virus, E1 et E2 jouent aussi un rôle dans la dissémination et la persistance virale.

Des analyses séquentielles de différents isolats du VHC révèlent que E1 et E2 possèdent des séquences nucléotidiques variables ce qui favoriserait l'échappement du virus à la réponse immunitaire [145]. Ces régions hyper variables (HVR) se retrouvent principalement dans la région N-terminale. Ainsi, une région hypervariable 1 (HVR-1) a été identifiée dans la séquence de la protéine E2, avec des différences de séquences inter- et intra-génotypiques allant jusqu'à 80%. Cependant, les propriétés physico-chimiques et la conformation générale de E2 reste relativement conservées parmi les génotypes, ce qui suggère un rôle important de cette région dans le cycle viral. La région HVR1 de la glycoprotéine E2 est la région la plus variable du génome du VHC [155].

2.2.2- Le polypeptide p7

Entre les régions structurales et non structurales du génome viral se trouve une petite protéine transmembranaire p7 d'environ 7kDa qui fonctionne comme un canal cationique [156, 157]. p7 est un polypeptide hydrophobe détaché de la polyprotéine par les peptidases-signal de l'hôte (voir figure 12) [117]. La petite protéine p7 appartient à la famille des viroporines de classe IIA. En effet, p7 est composé de 3 résidus basiques (exposés à la surface membranaire) et de deux

domaines transmembranaires (alpha-hélices) dont les extrémités C- et N-terminales sont orientées vers la lumière du RE (voir figure 14) [157, 158]. La région C-terminale de p7 contient une séquence de ré-initiation de la translocation qui peut fonctionner comme un peptide-signal (en présence de protéine-rapportrice). Comme les autres viroporines, p7 peut s'oligomériser et former complexes heptamérique ou hexamérique à la surface des cellules infectées favorisant ainsi la perméabilisation de la membrane plasmique. En outre, en tant que cofacteur de NS2, p7 est essentiel à l'assemblage du virus [159]. Certaines études suggèrent que p7 n'interviendrait ni à l'entrée, ni dans la réplication du VHC. Néanmoins, d'autres montrent que p7 favoriserait le « processing » de la polyprotéine virale ainsi que l'infectivité *in vivo* [160]. En effet, des virus mutés sur la séquence de p7 seraient moins infectieux que des souches sauvages [161, 162]. Ainsi, p7 joue un rôle majeur dans la maturation, dans la production et dans l'infectivité des virus [157, 161, 163]. Des études ont montré que p7 est localisé soit au niveau du RE, soit associé à la membrane plasmique ou associé à la membrane mitochondriale [158]. D'autres études révèlent que l'hétérodimère formé par E1-E2-P7-NS2, migre et localise au niveau des gouttelettes lipidiques où il participe à la morphogénèse virale [164]. De ce fait, p7 joue un rôle important dans l'assemblage de la capsid virale ainsi que dans l'enveloppement virions [165].

2.2.3- Les protéines non structurales

Dans un second temps, les clivages de la région non structurale de la polyprotéine sont induits par 2 protéases virales : l'auto-protéase virale NS2 et son cofacteur NS3, responsables du clivage auto-catalytique de la jonction NS2/NS3 et les sérines protéases NS3-NS4A responsables du clivage des jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B et NS5A/NS5B. Ces clivages de la polyprotéine donneront 6 protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B aux fonctions diverses [97, 117].

a- La protéine NS2

NS2 est une cystéine-protéase de 217 acides aminés composée d'une extrémité N-terminale hydrophobe constituant le domaine de fixation à la membrane et d'une extrémité C-terminale globulaire qui constitue le sous domaine de l'activité protéase cytosolique [166]. La fonction de la forme mature de NS2 reste inconnue mais au sein de la polyprotéine, NS2 contribue grandement à l'activité protéase responsable du clivage de la jonction NS2/NS3. En effet, NS2 possède un sous domaine auto-catalytique qui clive la jonction NS2/NS3 alors qu'en amont, le clivage de la jonction NS2/p7 se fait sous le contrôle des peptidases-signal cellulaires de l'hôte [167]. La forme clivée de

NS2, protéine hydrophobe de 21-23kDa, reste associée à la membrane du RE des cellules infectées avec les extrémités C- et N-terminales dirigées vers la lumière [167, 168]. Cette activité *cis* auto-catalytique fait intervenir les 180 premiers acides aminés de NS3 qui est donc considéré comme un cofacteur [169, 170]. D'ailleurs, de nombreuses études définissent le complexe NS2/3 comme une seule cystéine protéinase [171]. L'activité de cette protéase est contrôlée par la protéine chaperonne hsp90 [172]. Les analyses structurales de NS2 révèlent un dimère de cystéines protéases composé deux sites actifs, l'un apportant le résidu catalytique histidine/glutamate et l'autre la cystéine [173]. NS2 clivée localise dans la membrane du RE où elle constitue une protéine membranaire hydrophobe [168]. Composée de quatre domaines transmembranaires, la protéine NS2 est dégradée par le protéasome sous la direction de la protéine kinase CK2 [174].

Bien que cette protéase ne soit pas directement impliquée dans la réplication virale, des études montrent que ce clivage est essentiel à la formation d'une réplicase virale active [175]. Par ailleurs, d'autres études montrent que NS2 et p7 localisent au niveau des gouttelettes lipidiques et que NS2 interagit avec et inhibe la protéine spécifique du foie CIDEB-B (cell-death-inducing DFFA-like effector B) (pro-apoptotique). Par ailleurs, NS2 affecterait aussi la transcription des gènes et, serait essentiel à l'infectivité du virus [159, 176]. De façon, intéressante, la cartographie de NS2 de chimères (naturelles ou artificielles) inter-génotypiques du VHC suggère fortement qu'en plus de l'activité protéase, NS2 serait essentielle à l'assemblage et au relarguage des virus [159, 166, 177].

b- La protéine NS3

La protéine NS3 est une protéine multifonctionnelle hydrophile de 70kDa qui possède deux activités enzymatiques bien distinctes : une activité protéase (en N-terminale) et une activité hélicase / NTPase (en C-terminale) [145]. En effet, les 180 premiers acides aminés de la partie N-terminale agissent comme cofacteur de la cystéine protéinase NS2 pour cliver la jonction NS2/NS3 [169]. La région C-terminale restante constitue une sérine protéase, cofacteur de NS4A, pour cliver les jonctions entre les protéines non structurales en aval de NS3 (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B) ce qui aboutit au complexe de réplication virale actif [106]. Le clivage auto-catalytique NS3/NS4A est effectué uniquement en *cis* et nécessite l'activité de la protéine NS4A [170]. Des études suggèrent que des modifications post-traductionnelles telles que la méthylation, la phosphorylation et l'acétylation peuvent affecter la protéine NS3 [127]. Par ailleurs, d'autres études montrent l'activité de NS3 est potentialisée par le cofacteur NS4A qui favorise une meilleure conformation protéique [178]. En effet, le domaine N-terminal hydrophobe de NS4A

stabilise la protéase NS3 contre la dégradation protéolytique [179]. La protéine NS3 toute seule ne possède pas de domaine transmembranaire mais elle est associée, de façon non-covalente, au domaine central de NS4A qui est membranaire [167]. Des études ont révélé que cette activité était fonction d'une interaction stable entre les régions des deux protéines NS3 (aa 1041-1048) et NS4A (aa 1679-1688) [180]. Ainsi, la protéine NS3 a une localisation diffuse dans le cytoplasme et dans le noyau ou se retrouve liée à la membrane du RE selon qu'il est associé ou pas la protéine NS4A [181]. Par son activité sérine protéase, la chymotrypsine NS3 favorise la maturation de la polyprotéine du VHC [146]. La protéine NS3 serait également importante dans les étapes précoces de l'assemblage des particules virales. La région C-terminale de NS3 contient un domaine ARN hélicase et un domaine de fixation à l'ARN (nucléoside triphosphate). Ceci suggère que la protéine NS3 du VHC se lie au génome du VHC afin de réguler la réplication de l'ARN viral. Par ailleurs, des études ont montré que la protéase NS3 pouvait subir un clivage interne pour donner 2 protéines : NS3a (40kDa) et NS3b (23kDa) mais la fonction de ces sous unités protéique reste inconnue [182].

Tout comme la protéine Core, la protéine NS3 serait reconnue par le récepteur TLR-2 (toll-like receptor) et serait capable d'activer, *in vitro*, les facteurs pro-inflammatoires du système immunitaire inné *via* la coopération du récepteur TLR-2 avec ses corécepteurs TLR-1 et TLR-6 [135]. Cependant, des études montrent que la protéine NS3 peut bloquer la capacité des cellules hôtes à stimuler la réponse immune innée [183]. En effet, le complexe NS3/NS4A peut cliver deux protéines cellulaires TRIF et CARDIF (ou IPS-1) qui sont des protéines adaptatrices dans la signalisation cellulaire anti-virale (voir figure 14) [184]. Ce clivage déstabilise RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I), ce qui inhibe la réponse immune innée dirigée par l'IFN [185]. Par ailleurs, NS3 inhibe la transduction du signal induisant la synthèse de l'IFN de type I *via* le facteur IRF-3, ce qui en fait une cible attractive pour la thérapie anti-VHC [186]. De plus, NS3 interagit avec les sites catalytiques des protéines kinases A (PKA) et PKC en inhibant leur activité kinase, ce qui empêche leur translocation dans d'autres compartiments et altère la phosphorylation des protéines cibles, conduisant ainsi à une modification de l'expression de gènes cellulaires [187]. La figure 15 montre la fixation de la protéine du VHC sur les récepteurs membranaires TLR-2 et TLR-1/6 ainsi que le clivage de TRIF et CARDIF par le complexe NS3/4A.

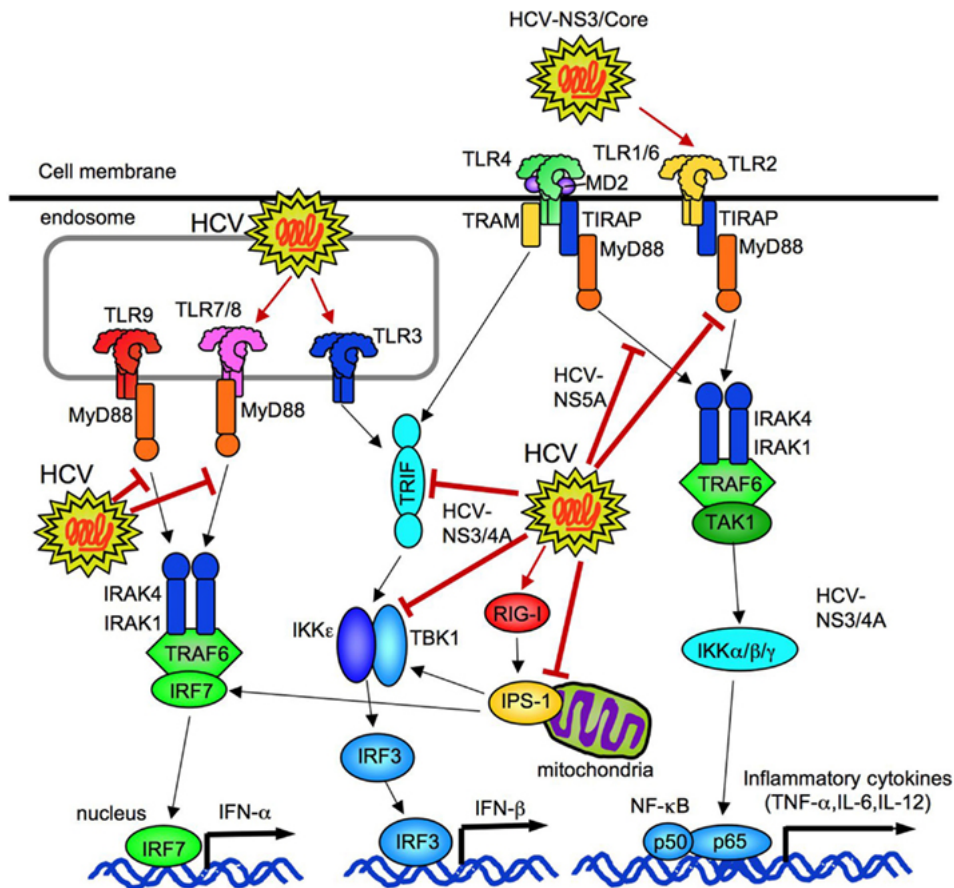


Figure 15 : Fixation de la protéine du VHC sur les récepteurs membranaires TLR-2 et TLR-1/6 ainsi que le clivage de TRIF et CARDIF par le complexe NS3/4A. Tout comme la protéine Core, la protéine NS3 du virus de l'hépatite C est reconnue à la surface cellulaire par le récepteurs TLR-2 en coopération avec ses corécepteurs TLR-1/6. Cette reconnaissance active la signalisation cellulaire et l'activation du facteur IKK $\alpha/\beta/\gamma$ puis du facteur NF- κ B. Cependant, la présence du complexe NS3/4A inhibe TRIF, IPS-1 et TBK1, ce qui limite la production de l'IFN- β . D'après *Ling Yang and Ekihiro Seki, Front. Physiol., 2012.*

Le rôle précis de la NS3 hélicase dans le cycle viral du VHC reste encore inconnu. Elle pourrait être impliquée dans l'initiation de la réplication de l'ARN en déroulant les structure tiges-boucles aux extrémités 5' et 3' de l'ARN viral [188]. NS3 peut également favoriser le complexe réplicase en retirant les structures secondaires de l'ARN viral ou en déplaçant les liaisons protéiques qui peuvent interférer avec la synthèse du génome viral [189]. Grâce à son activité enzymatique, la protéine NS3 peut aussi être impliquée dans la dissociation de la forme répliquante [190]. En outre, le domaine N-terminal de NS3 pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse, en interagissant avec la protéine suppresseur de tumeur p53 et en inhibant sa liaison à l'ADN ce qui bloquerait l'activité transcriptionnelle p53-dépendante qui en résulte [191]. De plus, une inhibition de l'activité du promoteur de p21/WAF1 par NS3 en coopération avec la protéine Core a également été décrite [192, 193]. Enfin, un court motif dans le domaine hélicase de NS3 pourrait se lier aux histones H2B et H4, induisant des changements de conformation et modifiant leur interaction avec l'ADN et la

formation des nucléosomes, permettant ainsi à des gènes inactifs d'être transcrits ce qui dérégulerait certaines fonctions biologiques [194]. Les effets pleiotropes de la protéine NS3 ont fait d'elle une cible majeure dans le traitement de l'hépatite C notamment grâce au développement des inhibiteurs de protéases.

c- La protéine NS4A

La protéine NS4A est une petite protéine transmembranaire de 8kDa constituée de 54 acides aminés qui agit comme principal cofacteur la sérine protéase NS3 [145]. La partie centrale de NS4A (acides aminés 21-32) est capable de se lier avec l'extrémité N terminale de la protéase NS3 afin de former le complexe NS3/4A [180, 195]. La formation de ce complexe permet un réarrangement du site catalytique de la protéase NS3 pour un alignement optimal des résidus et une meilleure conformation protéique [178]. Des études montrent qu'après le clivage de la polyprotéine, la protéine NS4A peut subir des modifications post-traductionnelles conduisant à sa biotinylation [127]. De plus, la protéine NS4A peut également être associée à NS5A dont elle favoriserait l'hyper-phosphorylation [196]. Tout comme la protéine NS3, la protéine NS4A pourrait favoriser l'échappement du virus à la réponse cellulaire *via* le clivage de TRIF et CARDIF (voire figure 15) [197].

La figure 16 est une représentation de la structure cristalline du complexe NS3/4A du virus de l'hépatite C.

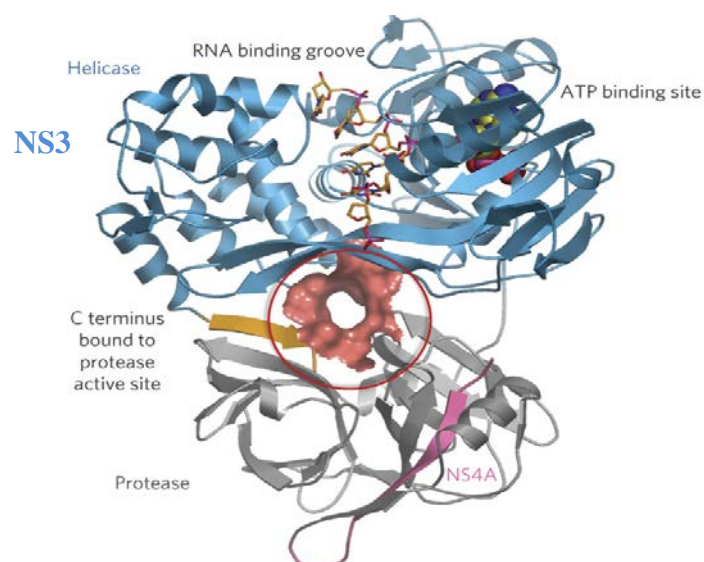


Figure 16 : Représentation de la structure cristalline du complexe NS3/4A du virus de l'hépatite C. La région *en rouge* constitue le domaine allostérique. La protéine NS4A *en rose* interagit avec le domaine sérine protéase de NS3 *en gris*. Le domaine hélicase de la protéine NS3 *en bleu* possède un site d'interaction avec l'ARN viral. Adapté de Saalau-Bethell S. M et al, *Nature chemical biology*, 2012

d- La protéine NS4B

La protéine NS4B est une protéine hydrophobe de 26kDa possédant 4 domaines transmembranaires [145, 146]. Aucune interaction directe entre les protéines NS4A et NS4B n'a été décrite mais des interactions entre NS4B et NS5A ont été rapportées [198]. Ces interactions seraient impliquées dans la réplication virale. En outre, les résidus du domaine C-terminal de la protéine NS4B seraient impliqués dans la formation du complexe de réplication viral [199]. Des études révèlent que la cette région C-terminale de NS4B serait palmitoylée lors des modifications post-traductionnelles puis localiseraient dans le cytosol. Cependant, certaines fractions de l'extrémité N-terminale peuvent également être retrouvées dans la lumière du RE [200]. La protéine NS4B posséderait donc une localisation subcellulaire ou serait associée à la membrane du RE (voir figure 16) [201]. En coopération avec NS5B, la protéine NS4B serait impliquée dans l'organisation du complexe de réplication. En effet, la protéine NS4B altère le réarrangement des membranes lipidiques intracellulaire dérivées du RE ce qui conduit à la formation des de structures membranaires en toile d'araignée « membranous web » essentielles à la réplication de l'ARN viral [202, 203]. En effet, ces structures membranaires en toile confèrent une trame solide pour l'association de l'ARN, des protéines virales, des protéines cellulaires et des cofacteurs essentiels à la réplication du virus [203]. En outre, la protéine NS4B est impliquée dans le transport de l'ARN le long du complexe de réplication et dans la maturation de la polyprotéine [201, 204]. Par ailleurs, d'autres études suggèrent que la protéine NS4B favorise l'hyper-phosphorylation de NS5A et qu'elle est impliquée dans l'inhibition des synthèses protéiques cellulaires [205].

e- La protéine NS5A

La protéine NS5A est une phosphoprotéine de 446 acides aminés associée au RE sous sa forme basale de 56kDa et sous sa forme hyper-phosphorylée de 58kDa [206]. L'extrémité N-terminale de NS5A est constituée d'une alpha hélice amphipathique unique qui sert d'ancre à la membrane du RE [207]. Sous sa forme basale, la protéine NS5A participe au processus de réplication de l'ARN viral grâce à ses liaisons avec l'extrémité 3' de l'ARN positif du VHC [208]. Quant-à la forme hyper-phosphorylée, elle serait impliquée dans l'assemblage des particules virales [208]. La protéine NS5a est phosphorylée par des sérines-thréonines kinases cellulaires (kinase A dépendante de l'AMPC, AKt, MKK6, MEK1, p70S6K et Casein kinase II) [209-213]. Le rôle précis de NS5A dans le cycle viral n'est pas complètement connu mais il fait probablement parti du complexe de réplication [214]. La protéine NS5A possède 3 domaines distincts I, II et III séparés par deux séquences peu complexes [215]. Le domaine I forme des homodimères *via* les contacts

entre les extrémités N-terminales. Cette dimérisation du domaine I contribue à la formation d'une signature de base localisée à la surface membranaire du RE et dirigée vers le cytosol. Par cette signature, NS5A peut lier l'extrémité 3' de l'ARN viral. La protéine NS5A serait ainsi impliquée dans la réplication du génome viral [170]. Le domaine II de la protéine NS5A inhiberait la PKR dans la voie de l'IFN- α tandis que le domaine III, hautement mutagène, posséderait des sites d'insertion et de délétion partielle [216, 217]. La protéine NS5A co-localise avec la protéine Core à la surface des gouttelettes lipidiques et elle est un facteur clé pour la formation des particules virales [218]. De multiples fonctions ont été attribuées à la protéine NS5A, notamment des actions sur l'apoptose, sur les voies de signalisation cellulaire et sur la régulation de la croissance cellulaire [219]. En effet, NS5A modulerait la réaction immunitaire anti-virale en interagissant avec MyD88, inhibant ainsi la signalisation *via* les TLRs et réduisant *in vitro* la production de cytokines [219, 220]. La protéine NS5A peut également modifier l'expression du TLR-4 dans les hépatocytes et lymphocytes B pour entraîner une augmentation de la production d'IFN- β et d'IL-6 susceptibles de moduler la réponse immunitaire *via* l'inhibition de la PKR dans la voie de l'IFN- α , ou en inhibant directement la réponse anti-virale de l'IFN- α . [221]. Par le biais de l'induction de l'IL-8, la protéine NS5A joue également un rôle important dans les mécanismes de résistance à l'IFN [216, 222]. De plus, les interactions entre NS5A et les facteurs de la voie Wnt/ β -caténine laissent penser que NS5A joue un rôle dans la carcinogénèse hépatique [222]. Différents rôles sont également attribués à la protéine NS5A. En effet, elle peut interagir avec le facteur suppresseur de tumeur PKR, stimuler la voie de survie PI3K/AKT, se lier à p53, inhiber la transcription de p21/WAF1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1), inhiber l'apoptose dirigée par p53, inhiber l'apoptose dirigée par le TNF (tumor necrosis factor), bloquer l'activation de la caspase 3 et activer la voie NF- κ B [223]. Enfin, des études révèlent que la protéine NS5A bloque le recrutement du facteur IRAK1 vers la protéine adaptatrice MyD88 ce qui aboutit à l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoire en réponse à la stimulation antigénique des récepteurs TLR-2, TLR-4, TLR-7 et TLR-9 [220]. Ces propriétés pleïotropes soulignent clairement l'implication de la protéine NS5A dans l'hépatocarcinogénèse virale C. Enfin, par son interaction avec la protéine NS5B, la protéine NS5A serait essentielle à la réplication du génome viral [224].

f- La protéine NS5B

La protéine NS5B est une phosphoprotéine de 65-68kDa qui possède un rôle essentiel dans la réplication virale. En effet, des études ont montré l'importance de son extrémité C-terminale dans la réplication de l'ARN viral en culture cellulaire [225]. En effet, la protéine NS5Ba contient un

motif conservé d'acides aminés, identifié comme l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) du VHC, qui assure la synthèse des brins d'ARN viraux positifs et négatifs [179]. La polymérase NS5B est caractérisée par la présence d'un motif GDD (Gly-Asp-Asp), caractéristique des polymérases ARN dépendantes des virus à ARN positif [226]. Cette polymérase assure la synthèse de nouveaux brins d'ARN en utilisant l'ARN viral de polarité positive comme matrice [204, 226]. Des études montrent que la protéine NS5B interagit avec les protéines virales NS3, NS4B et NS5A mais également avec des protéines cellulaires (cyclophiline B) pour former le complexe de réplication [227]. La polymérase NS5B est localisée dans la région péri-nucléaire, associée aux membranes cellulaires du RE, site de la réplication virale [228]. Des études révèlent qu'après les modifications post-traductionnelles de la polyprotéine, la NS5B peut devenir ubiquitinylée et/ou phosphorylée [127]. La structure cristalline de la protéine NS5B révèle un domaine catalytique possédant une conformation en « main droite » avec des sous domaines « doigts », « paume », et « pouce » [229, 230]. Le domaine en forme de « paume » contient le site actif de l'enzyme tandis que les domaines en forme de « doigts » et de « pouce » modulent les interactions avec la chaîne d'ARN [167]. La fixation de la NS5B sur la matrice et l'initiation de la synthèse du nouveau brin d'ARN sont régulées par une boucle en forme d'épingle à cheveux localisée dans le domaine en forme de « pouce ». Enzyme clé de la réplication du virus, la protéine NS5B représente la cible majeure des nouvelles thérapies anti-virales [231]. La figure 17 est une représentation de la structure cristalline de la polymérase NS5B.

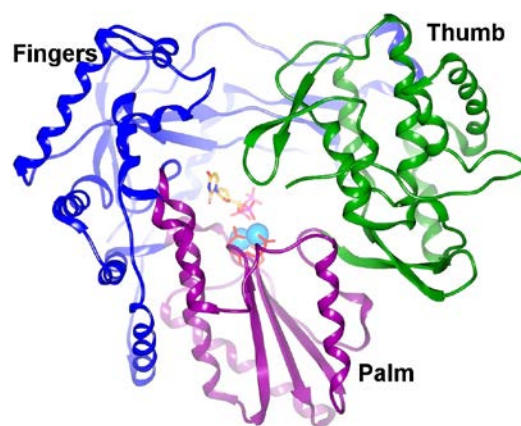


Figure 17 : Structure cristalline de la polymérase NS5B du virus de l'hépatite C. Le domaine site actif de l'enzyme se situe dans le domaine en forme « paume » en rose. Les domaines présentant une conformation en « doigts » et « pouce » sont représentés en bleu et vert respectivement. D'après O'Farrell Damien et al, 7th International Meeting on viral Hepatitis, Annual report, 2000.

Protéines	Masse moléculaire	Rôles et fonctions
Core	21-23kDa	- Morphogenèse des particules virales - Détourne la réponse immune et favorise la pathogenèse
E1	31kDa	- Entrée virale - Assemblage des particules virales - Favoriserait la fusion membranaire
E2	70kDa	- Entrée et internalisation du virus - Détourne la réponse immune grâce à sa région HVR1 - Assemblage des particules virales
p7	7kDa	- Maturation, la production et l'infectivité des virus - Assemblage de la capside
NS2	21-23kDa	- Clivage protéolytique de la polyprotéine (cofacteur de NS3) - Formation d'une réplicase active - Assemblage et relargage des virions
NS3	70kDa	- Clivage protéolytique de la polyprotéine (cofacteur de NS2) - Activité Protéase et activité hélicase en N- et C-terminal - Bloque la réponse immune anti-virale - Clive TRIF et CARDIF : échappement du virus
NS4A	8kDa	- Clivage protéolytique de la polyprotéine (cofacteur de NS3) - Clive TRIF et CARDIF : échappement du virus - Favorise l'hyper-phosphorylation de la NS5A - Contribue à la réplication virale et à l'assemblage des virions
NS4B	26kDa	- Formation des « membranous web » - Formation du complexe de réplication - Favorise l'hyper-phosphorylation de NS5A - Inhibe la synthèse des protéines cellulaires
NS5A	56-58kDa	- Permet la réplication et la formation des virus - Favorise la résistance à l'interféron - Participe à l'hépto-carcinogenèse virale C
NS5B	65-68kDa	- Polymérase virale ARN dépendante qui permet la réplication virale - Initie la synthèse du brin négatif
F/ARFP	7kDa	- Stimule une réponse immune spécifique - Favorise la progression de la maladie vers cirrhose - Participe à hépto-carcinogenèse virale C

Tableau 4 : Principaux rôles et fonctions des 10 protéines du VHC et de la protéine F/ARFP.

D'après Laurissa Ouaguia, 2015.

g- La protéine F /ARFP

Occasionnellement, une onzième protéine « F » (frame shift protein) ou « F/ARFP » (alternative reading frame protein), issue d'un cadre de lecture alternatif localisé dans la séquence de la protéine Core, peut également être générée [105]. Ce cadre alternatif de lecture ne possède pas de codon start AUG, suggérant que son expression implique des événements de translation inhabituels [167]. En effet, cette protéine F est générée par un changement de cadre de lecture du ribosome dans la région N-terminale de l'ORF codant pour la protéine Core. Sa fonction au cours du cycle viral reste indéterminée. Des études suggèrent que la protéine F est exprimée au cours de l'infection naturelle par le VHC et qu'elle stimule une réponse immunitaire spécifique [232]. En effet, elle peut up-réguler l'oncogène c-myc et down-réguler le gène suppresseur de tumeur p53 ce qui lui donne un rôle potentiel dans le processus de carcinogenèse hépatique [233]. De plus, des études récentes suggèrent que la protéine F peut down-réguler l'expression du T-BET et augmenter la fréquence des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ [234, 235], suggérant ainsi que la protéine F est associée à la progression de la cirrhose hépatique [236]. Le tableau 4 résume les protéines virales et leurs principales fonctions dans le cycle viral du VHC.

3- Variabilité génétique du VHC

La production quotidienne des virions serait supérieure à 10^{12} particules virales, notamment pendant la phase chronique [91]. Ce niveau élevé de réplication, associé à une absence de correction des erreurs de transcription, aboutit à l'émergence de nombreux variants constituant la quasi-espèce [237]. Ainsi, les mécanismes de la persistance virale reposent sur l'inefficacité de la réponse immunitaire mais surtout sur la cinétique de réplication rapide et sur la grande variabilité génétique du virus de l'hépatite C.

3.1- Les 7 géotypes du VHC

L'extrême variabilité génétique du VHC est la conséquence de l'absence de systèmes de correction des erreurs de réplication de l'ARN polymérase virale. En effet, on note environ 10^{-4} à 10^{-5} mutations par nucléotide copié, soit 1 erreur de copie par génome [238]. Ces mutations apparaissent lors de la synthèse des brins négatifs mais également lors de la synthèse des brins positifs. Le fort taux de réplication (10^{12} virions/ jour), associée à l'absence d'une activité exonucléasique 3'→5' (proof reading) accentue ce phénomène. L'accumulation des mutations, la sélection des séquences virales, les recombinaisons génétiques et la dissémination des virus correspondants ont conduit à la divergence progressive des différents géotypes actuels du VHC

[239]. Cette variabilité génétique est plus ou moins importante en fonction de la partie du génome considérée. En effet, la région de la nucléocapside est très conservée tandis que la région HVR1 de la glycoprotéine d'enveloppe E2 est la plus variable [155]. Selon la classification actuelle, le VHC est constitué de 7 génotypes majeurs possédant chacun une distribution géographique différente ainsi que des niveaux de diversités génétiques bien distincts [239-242]. Ces 7 génotypes seraient subdivisés en 67 sous-types désignés par des lettres minuscule (a, b, c, etc.) [243]. La distinction entre les 7 génotypes et les 67 sous-types est fonction de la différence dans leurs séquences nucléotidiques du génome total. Ainsi, les 7 génotypes du VHC diffèrent, en moyenne, les uns des autres d'environ 30% et les sous-types diffèrent les uns des autres d'au moins 25% en séquence de nucléotides dans la région codante [244]. En France, le génotype 1 est majoritaire (60% des cas) [245]. Ainsi, la caractéristique majeure d'un génotype est définie par origine phylogénétique. En effet, chaque génotype du VHC correspond à une branche individuelle de l'arbre phylogénétique (voir figure 18). Les sous-types, quant-à eux, ont une importance épidémiologique car ils sont associés à la dissémination du virus [243]. La figure 18 représente l'arbre d'évolution phylogénétique des 7 génotypes du virus de l'hépatite C.

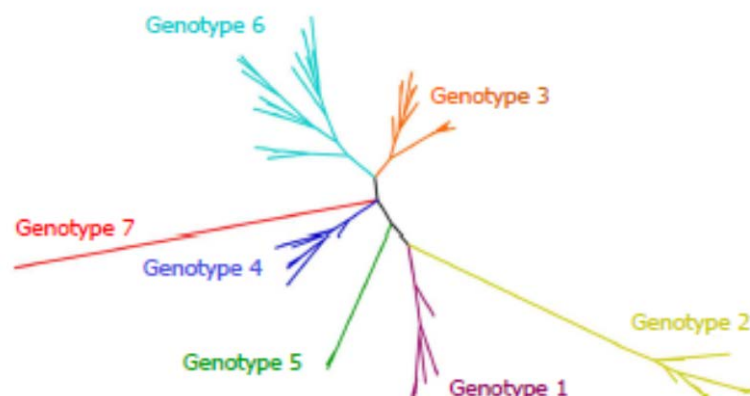


Figure 18 : Arbre d'évolution phylogénétique des 7 génotypes de VHC et des 67 sous types. Le génotype 6 est celui qui possède le plus de sous-types, signe d'une grande variabilité intra-génotypique. Le génotype 7 semble posséder moins de variabilités intra-génotypiques mais cela peu être due à sa découverte récente. *D'après Nathalia Acheverria, world journal of hepatology, 2015.*

3.2- Répartition géographique et distribution en quasi espèce

La répartition géographique des différents génotypes du VHC n'est pas homogène. En effet, les génotypes 1 et 3 ont une distribution importante dans les pays occidentaux, les génotypes 2 et 4 sont majoritairement présents en Afrique et le génotype 3 est majoritaire en Asie (voir tableau 5) [246-249]. Le génotype 7 n'a été découvert que très récemment et il serait essentiellement localisé

en Afrique centrale [250]. Par contre, les génotypes 1a, 1b, 3a, 2a, 2b et 2c semblent avoir une distribution plus globale. Ces derniers sont en effet, caractérisés par une variabilité génétique faible associée à une dissémination importante [247]. Par contre, le génotype 4 a une prévalence particulière en Afrique du nord, notamment en Egypte où il représente environ 90 % des patients chroniquement infectés [251, 252]. Certains variants sont endémiques et très divergents tandis que d'autres se disséminent rapidement mais avec peu de mutations [239]. Avant l'apparition des dernières générations d'antiviraux, la diversité des génotypes et des différents sous types du VHC ont toujours affecté la réponse aux traitements. En effet, seuls 10 à 50% des patients chroniquement infectés par le génotype 1b du VHC répondaient aux traitements interféron +/- ribavirine. Malgré les récents développements de ces nouvelles molécules anti-virales, des études récentes décrivent un effet limité de ces traitements sur les patients chroniquement infectés par les génotypes 3 et 4 (voir chapitre II) [253, 254].

Différents variants nucléotidiques du VHC se sont répandus à partir de ces génotypes. Ainsi, chez un même patient, le VHC se retrouve généralement sous la forme d'un mélange de variants viraux constituant la quasi-espèce [255]. Plusieurs quasi-espèces peuvent ainsi être isolées chez le même patient avec une hétérogénéité qui peut évoluer au cours de la maladie [255, 256]. Par ailleurs, il existe une distribution différente de la quasi-espèce entre deux individus infectés à partir de la même souche de virus. Ces mutants d'échappement ont été favorisés par la pression de sélection de la réponse immune, par les interactions virales avec l'hôte et par l'action des molécules thérapeutiques [257, 258]. En effet, une étude récente a identifié 112 interactions uniques entre les 7 génotypes majeurs du VHC et 94 protéines humaines [259]. Par ailleurs, les traitements antiviraux exercent une forte pression de sélection qui est souvent à l'origine de la modification de la quasi-espèce [256]. En effet, le génome du VHC subit d'importants changements évolutifs pour résister aux pressions de sélection exercées par l'organisme hôte et par les médicaments antiviraux. Par conséquent, la variabilité génétique du VHC est perçue comme un déterminant majeur de la persistance du virus et comme la cause principale des problèmes de résistances rencontrés au cours du traitement. Le tableau 5 présente la distribution mondiale des 7 génotypes du VHC.

Génotypes du VHC	Distribution mondiale
1	Distribution mondiale
2	Distribution mondiale
3	Distribution mondiale, prépondérant en Asie
4	Région méditerranéenne, Afrique, Moyen Orient
5	Afrique, Europe
6	Asie
7	Afrique

Tableau 5: Distribution globale des différents génotypes du virus de l'hépatite C. Les génotypes 1, 2 et 3 présentent une distribution globale. Les génotypes 4, 5 et 7 sont majoritairement présents en Afrique tandis que le génotype 6 est prépondérant en Asie. *D'après Laurissa Ouaguia, 2015.*

3.3- Tropismes cellulaires et compartimentation de la quasi-espèce virale

Les différences génétiques observées entre les génotypes et les sous-types d'une même quasi-espèce, au sein d'un individu, peuvent avoir des conséquences phénotypiques et influencer la biologie du virus. En effet, ces différences peuvent affecter le taux de réplication, le tropisme cellulaire, la pathogénèse, les lésions histologiques associées ou encore la réponse aux traitements [260]. La principale cellule hôte du VHC est l'hépatocyte. Pendant longtemps, le VHC a été considéré comme uniquement hépatotrope mais de nombreuses études ont montré que le VHC est capable de se répliquer dans des cellules d'origine hématopoïétique comme les cellules lymphocytaires [261-264]. En effet, le lymphotropisme du VHC représenterait l'étape la plus importante dans la pathogénèse virale [265, 266]. Par ailleurs, les corrélations entre infections par le VHC et la présence de cryoglobulinémies mixtes et le développement de lymphomes non hodgkiniens conforte l'idée d'un tropisme extra-hépatique du VHC [267, 268]. Ainsi, plusieurs études décrivent la présence de brins positifs et négatifs du génome du VHC dans les lymphocytes et les monocytes de la majorité des porteurs chroniques [269, 270]. Par ailleurs, l'autre argument en faveur d'une réplication extra-hépatique du VHC repose sur la détection, dans les cellules immunitaires, de variants différents de ceux qui circulent dans le plasma ou qui infectent le foie : on parle alors de compartimentation des variants viraux [271]. En effet, plusieurs études suggèrent que le VHC possède un réservoir primaire de réplication : l'hépatocyte et des réservoirs secondaires de réplication tels que les lymphocytes. Néanmoins, ces études soulignent que l'IRES des souches des isolats retrouvés dans les cellules immunitaires, possèdent une efficacité réduite dans des lignées hépatocytaires ainsi qu'une activité traductionnelle limitée [272, 273].

4- Le cycle viral du VHC

Malgré le développement de modèles cellulaires permettant de reproduire le cycle viral complet en culture cellulaire, les étapes du cycle viral du VHC sont encore mal connues. Néanmoins, grâce aux découvertes récentes et par analogie avec les autres flavivirus, les grandes étapes du cycle viral seraient : **(a)** attachement, entrée et internalisation du virus, **(b)** décapsidation et libération du génome, **(c)** expression et maturation des protéines virales, **(d)** réplication du génome viral, **(e)** assemblage des virions, **(f)** maturation et sécrétion des particules virales infectieuses (voir figure 19) [97, 146]. La figure 19 représente le cycle viral du virus de l'hépatite C.

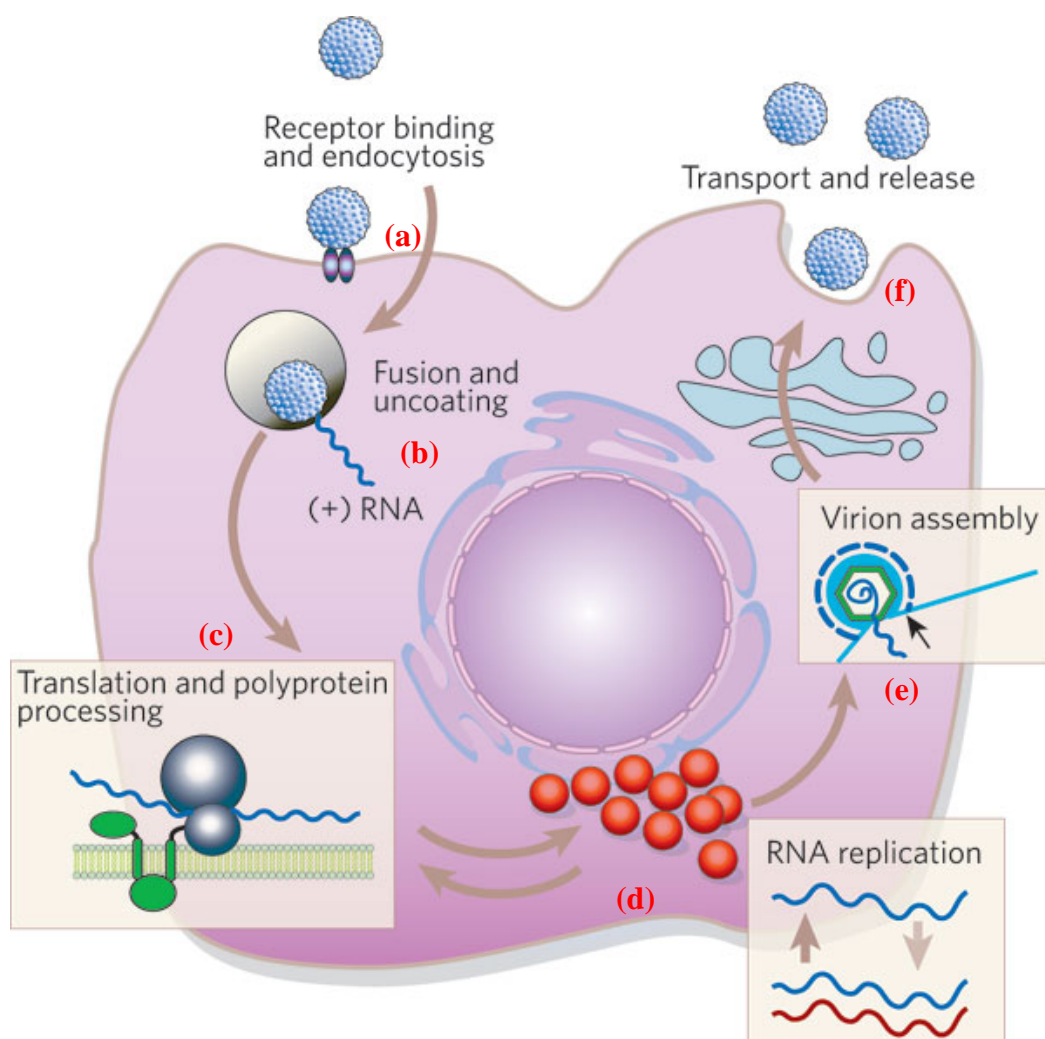


Figure 19 : Représentation schématique du cycle viral du VHC. **(a)** Attachement et Entrée du virus, **(b)** Fusion des membranes, Décapsidation et Libération du génome, **(c)** Expression de la polyprotéine et Maturation des protéines virales, **(d)** Réplication du génome viral, **(e)** Assemblage des virions, **(f)** Maturation et Sécrétion des particules virales infectieuses. *Adapté de Lindenbach B.D, Nature, 2005.*

4.1- Attachement, entrée et internalisation du virus

L'entrée du VHC dans la cellule hôte se déroulerait selon plusieurs étapes:

- L'attachement du virus à la cellule hôte *via* une interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et des récepteurs de la cellule cible (CD81, SCARB1, LDLR, etc.) ;
- L'entrée et du virus survenant au niveau des molécules de jonctions serrées (Claudine 1 et Occludine) ;
- L'internalisation virale par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante.

Le virus de l'hépatite C est enveloppée d'une double couche lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines (gp) d'enveloppe E1 et E2. Dans la circulation périphérique, le génome viral est généralement retrouvé sous forme de lipoviriparticules très hétérogènes et associées aux lipoprotéines de l'hôte [274]. La fixation des gp aux récepteurs de la cellule hôte est le point de départ du cycle viral du VHC [275]. De nombreux récepteurs de l'hôte ont été impliqués dans l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains. Ce sont : les glycosaminoglycanes (**GAGs**) [276], les héparanes sulfates (**HSPG**) [277], le récepteur de lipoprotéines de basses densités (**LDLR**) [278], la tétraspanine **CD81** [279], le récepteur scavenger de classe B de type 1 (**SCARB1**) [280], les protéines de jonctions serrées Claudine 1 (**CLDN1**) [279, 281] et occludine (**OCLN**) [282], le récepteur tyrosine kinases **EGFR** [149], le récepteur éphrin A2 (**EphA2**) [149], le transporteur de cholestérol **NPC1L1** [283] et le récepteur de transferrine **TfR1** [284]. D'autres corécepteurs d'entrée sont également décrits : les lectines de type-C **DC-SIGN** et **LC-SIGN** [285], la tétraspanine **CD9** [286], le récepteur scavenger **CD5** [270], le récepteur **eIF3B** [287], les **claudines 6 et 9** [288] et certains **TLR-s** [136].

Les particules virales infectieuses peuvent se retrouver libres ou associées à des lipoprotéines tels que les vLDL, LDL et HDL, ou à des apolipoprotéines tels que : apoA, apoB, apoC et apoE. La présence de ces complexes lipidiques leur confère une protection supplémentaire contre les anticorps neutralisants et facilite leur entrée dans les hépatocytes [289]. De plus, les apolipoprotéines jouent un rôle critique dans l'étape d'attachement du virus *via* leurs interactions avec les récepteurs de lipides [290]. **La première étape de l'entrée virale est caractérisée par l'attachement des complexes lipidiques aux récepteurs GAGs, HSPG, LDLR et SCARB1** [262].

La molécule LDLR, protéine d'environ 100kDa, est le principal récepteur associé à l'attachement du virus. En effet, elle reconnaît et lie les lipoprotéines présentes à la surface du virus telles que LDL et vLDL [262]. Les récepteurs GAGs et HSPG, reconnaissent quant-à eux, les apolipoprotéines [291].

Le récepteur SCARB1 est une protéine d'environ 80kDa qui joue trois rôles essentiels dans l'entrée virale. En effet, il se lie à l'apoE pour favoriser l'attachement du virus à la membrane cellulaire. De plus, la région de fixation du CD81 à E2 étant obstruée par le domaine hypervariable HVR1, l'interaction du virus avec SCARB1 induit un changement de conformation sur E2 [292]. Ce changement de conformation libère le site de fixation et favorise la fixation de la gp E2 au récepteur CD81. Enfin, le récepteur SCARB1 interagit directement avec E2, favorise l'infectivité et initie le transfert du virus vers le récepteur CD81 [293]. Après l'attachement, la gp E2 se lie au récepteur CD81 et la formation du complexe E2/CD81 est le point culminant de l'entrée virale.

La tétraspanine CD81 est le tout premier récepteur du VHC à avoir été décrit [294]. C'est une protéine d'environ 22kDa qui est exprimée par de nombreuses cellules notamment par les hépatocytes et les lymphocytes [269]. Des études ont montré que l'inhibition du CD81 abrogeait complètement la permissivité des cellules au virus de l'hépatite C [295, 296]. La molécule CD81 est donc essentielle à l'entrée du virus de l'hépatite C. Suite à la reconnaissance de E2, il y a formation d'un complexe E2/CD81 qui active les corécepteurs d'entrée EGFR, Tfr1 et NPC1L1 [262]. Ces corécepteurs d'entrée ont une importance majeure car des études montrent que l'inhibition d'un ou de plusieurs corécepteurs limite l'infection virale [149]. Par ailleurs, ils favorisent la formation du complexe CD81-Claudine1.

La seconde étape de l'entrée virale se déroule au niveau des jonctions serrées *via* les interactions du virus avec les molécules Claudine1 et occludine. En effet, la Claudine1, protéine transmembranaire d'environ 23kDa, a été identifiée comme une protéine essentielle à la phase d'entrée du virus [281]. Elle est exprimée dans tous les tissus épithéliaux, avec une prédominance dans le foie [297]. Elle peut être localisée au niveau des jonctions serrées mais aussi à la surface basolatérale des hépatocytes. Des études montrent que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la Claudine 1 inhibe l'infection des hépatocytes, en culture primaire, par tous les génotypes du VHC [298]. D'autres études suggèrent que SCARB1 et la Claudine 1 seraient les facteurs essentiels de l'hépatotropisme du VHC tandis que d'autres révèlent que le récepteur CD5 serait important pour le lymphotropisme du VHC [270, 299]. La Claudine 1 s'associe au CD81 pour former un complexe d'attachement essentiel à l'internalisation du virus [300]. Cette internalisation se fait principalement au niveau des jonctions serrées.

L'occludine est une protéine transmembranaire d'environ 65kDa également exprimée dans les jonctions serrées des cellules polarisées [282]. L'inhibition de l'expression de l'occludine conduit à une diminution de l'infection des cellules hépatiques infectées [301]. Elle participe donc activement à la perméabilité membranaire au virus de l'hépatite C.

La troisième étape de l'entrée virale est l'internalisation du virus qui se fait par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante [302]. Cette internalisation s'effectue au niveau des

jonctions serrées qui assurent la polarisation cellulaires [303]. La figure 20 montre l'implication des principaux récepteurs du VHC au cours de l'entrée virale.

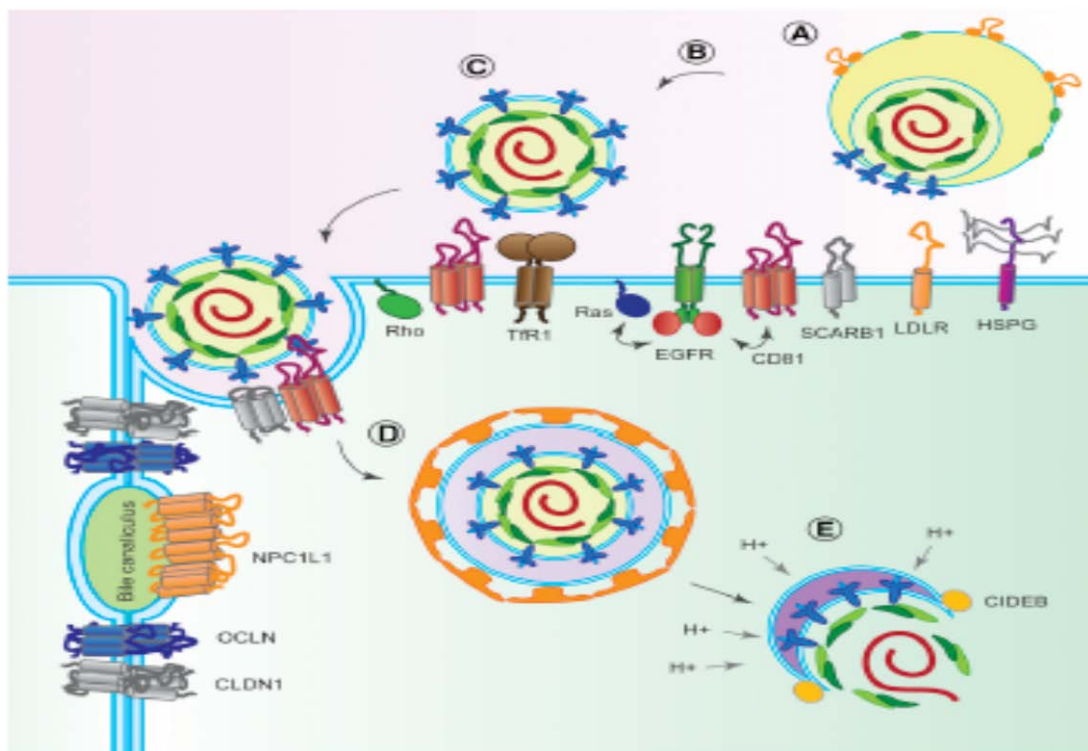


Figure 20 : Mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite C et rôle des principaux récepteurs. Les lipoprotéines associées au VHC s'attachent aux récepteurs HSPG, LDLR et SCARB1 (A). L'interaction du virus avec SCARB1 modifie la conformation de la gp E2 qui se fixe au récepteur CD81 (B). Le complexe E2/CD81 active les corécepteurs d'entrée EGFR, Tfr1 et NPC1L1 (C). Par la suite, l'internalisation se fait *via* un mécanisme d'endocytose au niveau des molécules de jonctions serrées CLDN1 et OCLN (D). Enfin, la présence de la protéine CIDEB sur l'enveloppe virale stimule la décapsidation et la libération du génome (E). *D'après Ding, Q et al, Cell host and microbes, 2014.*

4.2- Décapsidation et libération du génome

Le virus ainsi internalisé se retrouve dans un endosome recouvert de molécules de clathrine [302]. Progressivement, le pH de cet endosome va diminuer et devenir de plus en plus acide. Cette acidification de l'endosome va favoriser la fusion des membranes de l'enveloppe du VHC et celle de l'endosome [304, 305]. La fusion de ces membranes est rapidement suivit par la décapsidation du virus puis la libération du génome virale dans le cytoplasme [97, 262]. Des études montrent que la présence de la protéine CIDEB sur l'enveloppe virale stimule la décapsidation et favorise la libération du génome viral [262, 305].

4.3- Initiation de la traduction IRES-dépendante et coiffe indépendante

L'ARN viral libéré dans le cytoplasme est traduit par un IRES localisé dans la région non codante 5' du génome [97]. Contrairement au processus d'initiation de la traduction des ARN messagers chez les eucaryotes, l'IRES du VHC recrute et positionne directement les sous-unités ribosomales 40s sur le codon start AUG sans intervention des facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction (eIFs) [119]. Ce positionnement est suivi de la fixation de facteurs de traduction eIF3 et eIF2-GTP-Met-tRNA qui stabiliseront la pré-initiation de la traduction [121]. Les sites de fixation d'eIF3 sur l'IRES sont situés principalement sur la structure cruciforme du domaine III, englobant les sous-domaines IIIa, IIIb et IIIc [119]. Enfin, les facteurs eIFs sont relargués dans le cytoplasme, permettant ainsi la fixation de la sous unité 60s pour la formation d'un ribosome 80s. La formation du ribosome 80s initie la synthèse protéique. Les ribosomes cellulaires 40s, 60s et 80s interagissent principalement avec le domaine III de l'IRES [119]. Néanmoins, tous les domaines de l'IRES seraient nécessaires à la réplication du génome viral [306]. Des études révèlent que le petit ARN mir122 stimule la traduction en favorisant l'association des sous unités ribosomales avec l'ARN viral [115]. Cette traduction est initiée par le codon situé au nucléotide 342 et les séquences entourant ce codon se trouvent sous la forme d'une boucle [118, 307]. La traduction s'effectue au niveau de la membrane du RE et aboutit à l'expression d'une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés [117]. D'autres études montrent que les facteurs d'autophagie (Beclin1, Atg5) favorisent la traduction et initient la réplication du VHC [308]. Ainsi, l'IRES du VHC permet la traduction de l'ARN viral de manière coiffe indépendante aboutissant à la production de la polyprotéine virale qui sera clivée en 10 protéines résultantes.

4.4- Expression et maturation des protéines virales

La polyprotéine précurseur, organisée comme suit NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH, subira des modifications co- et post-traductionnelles puis sera clivée en 10 protéines virales. Dans un premier temps, elle est clivée par les signal-peptidases cellulaires (SPP) de l'hôte au niveau des jonctions C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2 pour donner les 3 protéines structurales E1, E2, Core et la protéine p7. Ensuite, l'auto-protéase virale NS2 clive la jonction NS2/NS3. Enfin, la sérine protéase virale NS3-4A clive le reste de la polyprotéine virale pour donner les 6 protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. Toutes ses modifications s'opèrent dans la membrane du réticulum endoplasmique à laquelle ces protéines sont directement ou indirectement associées et où elles exercent leur fonctions [117]. En parallèle, une protéine F/ARFP (également appelée protéine Core+1) peut être générée à partir d'un cadre de lecture alternatif [105].

4.5- Réplication du génome viral

Le clivage de la partie C-terminale de la polyprotéine pour donner des protéines non structurales permet de l'expression d'un complexe de réplication actif dans lequel chaque protéine exerce une fonction particulière. L'initiation de la réplication de l'ARN nécessite des structures hautement conservées, localisées dans la région non codante 3', qui servent de matrice [110]. Dans un premier temps, la protéine NS4B va favoriser la formation de structures vésiculaires sous forme de toile d'araignée que l'on appelle « membranous web » [202, 203]. Ces structures vésiculaires contiennent des fragments de membranes du RE et des gouttelettes lipidiques [203]. Ce réarrangement membranaire constitue le lieu où l'ARN viral est amplifié par l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B [179]. L'ARN positif du génome est répliqué en ARN négatif et ce dernier sert lui-même de matrice pour la synthèse de nouveaux brins de polarité positive. Les ARNs ainsi synthétisés serviront soit (i) de matrices pour la réplication virale, (ii) seront traduits pour donner de nouvelles protéines virales ou (iii) seront encapsidés et enveloppés pour la formation des nouvelles particules virales infectieuses [146].

4.6- Assemblage des néovirions

Après la réplication, les protéines Core et NS5A traduites s'accumulent sur les gouttelettes lipidiques. En parallèle, la NS5B favoriserait la migration des brins d'ARN positifs du site de réplication vers le complexe protéine Core-gouttelettes lipidiques [309]. L'assemblage viral semble donc extrêmement lié au métabolisme des lipides. Par ailleurs, le complexe Core-NS5A stimule l'encapsidation du génome viral au niveau du RE *via* un mécanisme dépendant de la synthèse des lipoprotéines de basse densité (VLDL) [310]. Les virions ainsi formés sont enveloppés d'une double couche lipidique dans laquelle s'incorpore les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 avant leur sécrétion.

4.7- Sécrétion des particules virales infectieuses

Les mécanismes de sécrétion des particules virales infectieuses restent encore mal connus. De part leur association avec le métabolisme lipidique, les mécanismes de production des virions du VHC seraient associés à la voie de sécrétion du cholestérol. En effet, après l'assemblage, les virions s'associeraient aux lipoprotéines et apolipoprotéines avant de transiter par l'appareil de Golgi [146, 311]. Enfin, les virions (entouré de lipides) seraient transportés dans des vésicules de sécrétion de lipides puis excrétés dans le compartiment extracellulaire [312]. Cependant, des études récentes ont décrit, dans le plasma de patients, des particules virales infectieuses libres ou associées à des exosomes suggérant ainsi d'autres voies de sécrétion des particules virales [313].

C/ LES MODELES D'ETUDE DU VHC

Depuis sa découverte, l'impact précis du virus de l'hépatite C sur l'organisme humain reste difficile à étudier. En effet, le tropisme spécifique du VHC dans d'hôte et l'absence de modèles d'étude appropriés ont longtemps entravés la recherche sur l'hépatite C. Ainsi, étudier l'histoire naturelle du VHC, comprendre les mécanismes de dissémination du virus ou analyser les réponses immunes associées demeurent difficiles, notamment à cause du manque de modèles animaux possédant un système immunitaire fonctionnel et développant une maladie hépatique identique à celle de l'homme. Néanmoins, de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* ont été mis en place afin de permettre une meilleure compréhension du mécanisme d'action du virus et tester l'efficacité des molécules anti-virales [314].

1- Les modèles *in vivo*

Les modèles *in vivo* représentent un atout majeur dans l'étude de l'infection par le virus de l'hépatite C. Ces modèles comprennent essentiellement les chimpanzés, les souris transgéniques, les souris immuno-déficientes chimères, etc.

1.1- Le Chimpanzé

Le Chimpanzé est l'autre hôte naturel du virus de l'hépatite C, ce qui en fait le meilleur modèle animal pour l'étude de l'infection par le VHC ainsi que l'étude des réponses immunes innées et adaptatives associées [95]. Des études ont clairement mis en évidence le tropisme restreint du VHC chez l'homme (foie et cellules mononuclées du sang périphérique) et dans le foie de chimpanzé [315, 316]. En effet, les chimpanzés ont joué un rôle essentiel dans la découverte du virus [7]. De plus, le chimpanzé reste l'unique modèle qui puisse être infecté et donner une réplication virale active 3 jours post-inoculation. Par ailleurs, l'infection peut devenir aiguë puis chronique pendant plusieurs mois avec un pic de charge virale à 7 semaines [317]. Ainsi, le chimpanzé a permis de comprendre le mécanisme d'infection, la réplication et les réponses immunes innées et adaptatives résultantes [318]. Ce modèle animal a été très important pour la compréhension de l'histoire naturelle du virus. Néanmoins, l'hépatite C de l'homme reste très différente de celle du chimpanzé car cette dernière, bien que chronique, n'évolue pratiquement jamais vers la fibrose ou cirrhose [319]. Or cette évolution est une conséquence importante chez l'homme [16]. Une autre différence réside dans le fait que l'hépatite C développée chez le

chimpanzé est moins sensible au traitement antiviral à l'IFN [320]. Par ailleurs, le coût élevé, la disponibilité limitée du matériel et les nombreuses considérations éthiques limitent l'utilisation des chimpanzés.

1.2- Le Tupaïa

Le Tupaïa est un petit mammifère insectivore proche des primates qui est également utilisé pour l'étude de l'histoire du VHC [321]. En effet, des études montrent une réplication active du VHC ainsi qu'une synthèse de virions dans les hépatocytes primaires de ce mammifère [322]. Par ailleurs, contrairement au chimpanzé, ce modèle peut quelques fois développer des nodules cirrhotiques et cancers consécutifs à une infection par le VHC [323]. Cependant, contrairement à l'homme, le Tupaïa maintient rarement une réponse virologique soutenue aux traitements anti-VHC [323].

1.3- Le modèle de rat

En 2001, des chercheurs ont mis sur pied un modèle de rat immunocompétent et tolérant aux lignées d'hépatomes humains Huh7 xénotransplantées [324]. Cette étude a mis en évidence une augmentation de l'albumine dans le foie et dans le sérum de ces rats. De plus, elle a révélé la présence d'ARN viral détectable 4 semaines après inoculation avec un pic apparaissant vers la 12^{ème} semaine [325]. Par ailleurs, ce modèle a permis d'obtenir des prélèvements répétés de sang et de tissus permettant d'étudier l'entrée virale, la réplication et les lésions hépatiques induites par la réponse immunitaire. Ainsi, le modèle de rat offre un outil de dépistage conséquent pour l'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques. Néanmoins, l'impossibilité de transplanter des quantités plus importantes de Huh7 a pour conséquence le développement de taux de virémie très faibles comparés à ceux de l'homme, ce qui limite l'utilisation d'un tel modèle [325].

1.4- Le modèle de souris

Depuis sa découverte, plusieurs travaux essaient de comprendre pourquoi le foie murin résiste à l'infection naturelle par le virus de l'hépatite C. En effet, seul 300 gènes diffèrent entre le génome de souris et celui de l'homme [326]. Par ailleurs, les souris sont pratiques d'utilisation car petites, facilement manipulables, peu chères, plus disponibles, cycle de vie très court, grande capacité de reproduction mais surtout, génétiquement modifiables ce qui en fait un modèle de choix en recherche sur le virus de l'hépatite C [314]. Ainsi, le développement de modèles de souris pouvant

être solidement greffés avec des hépatocytes humains a constitué un pas important dans la compréhension de l'hépatogenèse virale C. De ces différents modèles, on peut citer :

Les souris chimères de foies humains : Elles sont constituées de souris humanisées sévèrement immuno-déprimées (SCID) et xénotransplantées avec des cellules hépatiques humaines. Le tout premier modèle de souris génétiquement humanisées et pouvant supporter efficacement le cycle viral complet du VHC *in vivo* fut le modèle de souris humanisé **Alb-uPA/SCID** développé en 2001[327]. C'est un modèle de souris transgéniques chimères dans lesquelles l'expression de l'activateur plasminogène urokinase (uPA), placée sous le contrôle spécifique du promoteur de l'albumine, conduit à la destruction totale du foie murin. Les auteurs ont xénotransplanté du tissu hépatique humain et observé que ce modèle permettait d'obtenir une infection prolongée caractérisée par un titre viral important après inoculation avec le virus isolé de sérum de patients. De plus, le caractère SCID (absence totale de lymphocytes T et B) a facilité la greffe d'hépatocytes humains et permit d'étudier l'entrée virale [327]. Ce modèle a connu une avancée importante avec le développement de souris **FRG** déficientes **Fah**^{-/-} (Fah : fumaryl aceto-acetate hydrolase) **Rag2**^{-/-} (Rag2 : recombination activating gene 2) et **IL-2rg**^{-/-} (gamma chain of the receptor for IL-2) [328]. En effet, grâce à l'utilisation d'un traitement régulant l'hépatotoxicité, ces modèles favorisent la xénotransplantation d'hépatocytes humains à tout âge de la vie de la souris, ce qui augmente grandement la robustesse du modèle SCID [329]. Cependant, comme les souris SCID, ces modèles sont caractérisés par des réponses immunes cellulaires et humorales, consécutives à une infection, très réduites. Ainsi, ils ne permettent ni d'étudier la pathogenèse de la maladie hépatique, ni les thérapies immunologiques, ni le développement de vaccin ou anticorps neutralisants [330].

Les souris génétiquement humanisées : Elles sont caractérisées par une expression stable ou transitoire de facteurs humains exogènes qui rendent la souris permissive à l'infection. Récemment, des avancées majeures ont vu le jour avec le développement de **souris ICR-C/O^{tg}** et **Rosa26-Fluc**. Ce sont des souris génétiquement humanisées qui possèdent une expression transgénique stable du **CD81** et de l'**Occludine** permettant une entrée virale. Plus récemment, le développement de **souris Alb-4hEF Stat**^{-/-}, **Irf1**^{-/-} et **Irf7**^{-/-} (hEF : human entry factor), génétiquement humanisées grâce à l'expression transgénique stable des récepteurs **CD81**, **SCARB1**, **Claudine 1** et **Occludine**, sous le contrôle du promoteur albumine a permis de rendre les foies de souris permissives à l'infection [331]. Néanmoins, ce modèle de souris possède une inhibition de certains gènes antiviraux (Irf, Stat). Ainsi, il reste très peu immunocompétent et ne permet pas d'analyser efficacement la pathogenèse virale C induite par le système immunitaire de l'hôte [332].

Les souris possédant à la fois un système immunitaire humain et une greffe de cellules hépatique humaines (souris HIS-HUHEP): Ces modèles d'étude n'ont été développés que très récemment et ils constituent une avancée essentielle dans l'étude de l'histoire naturelle du VHC. On peut citer, entre autre, le modèle de souris **AFC8-huHSC/hep** constitué d'une chimère SCID reconstituée avec des cellules souches hématopoïétiques humaines (HSC) CD34+ et xénotransplantées avec des cellules humaines de foie fœtal [333]. On peut également citer, le modèle de souris **BALB/c Rag2^{-/-} IL-2R γ c^{-/-} NOD.sirpa uPA^{tg/tg}** qui donne un niveau plus élevé de chimères hépatiques tout en permettant le développement robuste des lignées myéloïdes et lymphoïdes [334]. Ces modèles possèdent donc un foie et un système immunitaire humains ce qui permet d'analyser la réplication virale intra-hépatique du VHC ainsi que la réponse immune humaine associée.

Outre les modèles décrits ci-dessus, d'autres modèles existent également. Ce sont par exemple les souris sauvages infectées avec un virus modifié *in vitro* afin qu'ils s'adaptent aux récepteurs hépatocytaires murins, les modèles de zébrafish ou modèles de souris sauvages infectées avec des vecteurs adénoviraux afin qu'ils expriment des protéines transgéniques au niveau du foie murin [335]. Le tableau 6 résume les spécificités des modèles utilisés pour l'étude *in vivo* du VHC.

Modèles <i>in vivo</i>	Particularités / Limites
Chimpanzé	<ul style="list-style-type: none"> -Autre hôte naturel du VHC -Permet l'étude de l'histoire naturelle du VHC -Disponibilité limitée due aux considérations éthiques -Maladie évoluant très peu vers la fibrose ou cirrhose
Tupaïa	<ul style="list-style-type: none"> -Etude de l'entrée du VHC dans le foie de mammifères -Elévation transitoire de la virémie (phase aiguë) -Incapacité d'étudier la chronicité de l'infection
Rat	<ul style="list-style-type: none"> -Xénotransplantation de lignées d'hépatome Huh7 -Obtention de prélèvement de tissus pour étudier l'entrée -Impossibilité d'injecter de forte quantité de Huh7
Souris génétiquement humanisées	<ul style="list-style-type: none"> -Souris partiellement immunocompétentes -Xénotransplantation des foies humains -Etudes de la réplication du VHC dans le foie humain -Analyse incomplète du rôle du système immunitaire dans l'infection
Souris possédant un foie chimère	<ul style="list-style-type: none"> - Souris sévèrement immunodéprimées - Etudes de la réplication du VHC dans le foie humain - Impossibilité d'évaluer l'impact de la réponse immune - Incapacité d'étudier la pathogenèse

Tableau 6 : Spécificités et limites des modèles utilisés pour l'étude *in vivo* du VHC. D'après Laurissa Ouaguia, 2015.

2- Les modèles *in vitro*

Alors que certains virus sont faciles à isoler et à manipuler dans des modèles de culture cellulaire, le VHC reste difficile à dupliquer *in vitro*. Ainsi, l'étude complète du VHC reste compliquée en raison de son tropisme restreint. Les cellules sensibles à l'infection naturelle par le VHC sont : les hépatocytes, les lymphocytes, les cellules biliaires et les entérocytes [336]. Actuellement, les modèles *in vitro* les plus couramment utilisés consistent en l'infection d'hépatocytes humains en culture primaire (HFH, PH), de cellules primaires immortalisées (IHH) et de lignées d'hépatomes humains (Huh7, HepG2, HepaRG, etc.) [51, 337].

- **Les cellules et lignées cellulaires utilisées**

L'étude de l'infection par le VHC passe par l'utilisation de cultures primaires d'hépatocytes immortalisées (IHH) par l'antigène T du virus SV40 ou des cultures primaires de foie foetal humain (HFH) [333]. Cependant, des travaux ont montré que les IHH, bien qu'aussi permissives que les Huh7 à l'infection, conduisaient à une production de particules virales très faible [338]. Par ailleurs, l'utilisation courante de HFH reste très limitée en raison du manque de matériel. Pour y remédier, les chercheurs ont généralisé l'utilisation d'hépatocytes primaires humains adultes (PHH) obtenus lors d'une résection chirurgicale. Ce modèle a l'avantage de préserver les fonctions biologiques des cellules (cytochrome P450, enzymes de conjugaison, transporteur, métabolisme lipidique, etc.) [339]. Néanmoins, la réplication aboutit généralement à une production faible de virus infectieux [340]. Ainsi, afin d'étudier tous les aspects de l'infection par le virus de l'hépatite C, l'utilisation de lignées cellulaires (Huh7, HepG2 et HepaRG) restent l'un des meilleurs choix. En effet, ces lignées sont facilement accessibles et directement manipulables. De plus, le fait qu'elles soient immortalisées favorise la reproductibilité des résultats. Cependant, bien que dérivées d'hépatomes humains, elle ne reflètent pas réellement la physiologie et la polarisation des hépatocytes primaires [332]. Plus récemment, travaux ont fait part de l'utilisation des tranches de foie (350µm) prélevées lors d'hépatectomies mais ce modèle reste encore à mettre sur pied [341].

Afin d'analyser le cycle complet du VHC, différents modèles d'infections *in vitro* ont été développés. Ces modèles d'infections comprennent : Les particules dérivées de séra VHC+ (VHCser) ; les modèles réplicons ; les pseudoparticules VHCpp, les particules virales VHC-like particles, les modèles lentiviraux et le modèle d'infection en culture cellulaire VHCcc/JFH1 [51, 329, 342, 343].

2.1- Infection par les particules dérivées de séra de patients infectés par le VHC (VHCser)

Il n'existe toujours pas de système de culture cellulaire robuste pour les infections par les séra dérivés de patients VHC+ (VHCser). En effet, la présence d'anticorps neutralisant dans le sérum ainsi que le tropisme viral rendent difficile la mise en place de ce modèle. Néanmoins, en utilisant des traitements lipidiques PIDR (protein intra-cellular delivery reagent), des études montrent une internalisation des VHCser dans les cellules Huh7 [344]. De plus, les VHCser seraient également capable d'infecter les hépatocytes en culture primaire et cette infection serait dépendante de la tétraspanine CD81 [342, 345].

2.2- Infection par les modèles de particules virales semblables au VHC (VHC-LPs)

Des chercheurs ont produit des particules virales infectieuses, semblables aux virions produits après infection par les VHCser. Ces particules virales, appelées « VHC-like particles ou VHC-LPs » ont été produites dans les cellules d'insectes en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression des protéines structurales E1, E2 et Core du VHC [346]. Leurs études ont montré que ces particules HCV-LPs avaient la capacité d'internaliser les hépatocytes humains et les lignées d'hépatomes humains [347]. Par ailleurs, en utilisant le virus recombinant SFV (Semliki Forest Virus) exprimant les gènes codant pour les protéines structurales du génotype 1a ou en utilisant le virus recombinant VSV (Virus Stomatite Vésiculaire) portant les gènes codant les protéines structurales de génotype 1b, d'autres particules virales ont pu être élaborées [348, 349]. Ces particules ont été très utilisées pour l'étude de la structure et de la fonction des protéines d'enveloppe, l'étude de l'assemblage de la particule virale et pour mettre en évidence la fonction des peptidases-signal cellulaires sur le génome viral [347].

2.3- Infection par les pseudo-particules lentivirales ou rétrovirales (VHCpp)

Les pseudo-particules virales VHCpp sont constitués des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 non-modifiées et assemblées sur des particules rétrovirales ou lentivirales [350, 351]. Elles sont produites dans la lignée cellulaire 293T par transfection de vecteurs plasmidiques d'expression codant pour E1/E2. Ces particules sont également constituées du génome et des protéines tag-pol du virus MLV (mouse leukemia virus) associées à un gène rapporteur GFP ou luciférase. Des études montrent que ces particules virales sont hautement infectieuses et qu'elles peuvent internaliser les hépatocytes humains et les lignées d'hépatomes (Huh7, HepG2 et Hep3b) [352]. Par ailleurs cette internalisation serait dépendante de la présence des récepteurs d'entrée CD81 et SCARB1 [351]. En

effet, la présence de la GFP (green fluorescent protein) ou de la luciférase dans les VHCpp a permis une étude rapide et précise des mécanismes d'entrée des différents génotypes viraux [350, 352]. Par ailleurs, ce système permet d'analyser, efficacement, l'effet des anticorps neutralisants sur le processus d'entrée [353, 354].

2.4- Les systèmes réplicons

Les réplicons sont des molécules d'ARN bi-cistroniques subgénomiques et répliquatives du VHC. Le tout premier réplicon a été développé en 1999 [343]. Ce réplicon était composé de l'extrémité 5'- IRES du VHC, du gène de résistance à la néomycine, de l'IRES du virus EMCV (myocardite encéphalique), des protéines non structurales NS3 à NS5B du VHC et de l'extrémité 3' du VHC [343, 355]. Dans ce système, l'IRES du VHC favorise la traduction du gène de résistance à la néomycine. L'expression de la néomycine permet de sélectionner les clones résistants après transfection et l'IRES du virus EMCV dirige la traduction des protéines non structurales NS3 à NS5B du VHC (voir figure 21) [343]. La transfection de ce réplicon dans les lignées d'hépatomes Huh7 ou HepG2a permis la sélection de clones résistants, possédant des mutations adaptatives et capables de se multiplier [343]. L'utilisation de ces ARNs a ainsi permis d'observer une réplication virale active [356]. Cependant, celle-ci n'aboutit pas à une grande production de particules virales infectieuses [357]. Ce modèle a servi de base au développement d'autres réplicons rapporteurs fondés plus ou moins sur le même principe [358, 359]. Ainsi, le modèle réplicon constitue une avancée majeure dans l'étude de la réplication virale et de la localisation cellulaire des protéines virales mais n'est d'aucune utilité dans la compréhension des mécanismes de production virale [360]. La figure 21 donne une représentation schématique du tout premier réplicon subgénomique du VHC tel que développé en 1999.

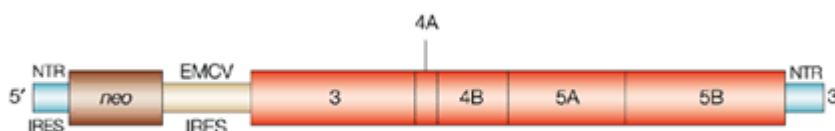


Figure 21 : Représentation schématique du réplicon subgénomique développé pour l'étude du VHC. Ce réplicon est composé de l'extrémité 5'-IRES du VHC, du gène de résistance à la néomycine, de l'IRES du virus EMCV, des protéines non structurales du VHC NS3 à NS5B et de l'extrémité 3' du VHC. D'après Bartenschlager Ralph, *nature reviews drug discovery*. 2002.

2.5- Forme soluble de l'ecto-domaine E2 (sE2)

C'est le tout premier outil à avoir été utilisé pour l'étude des récepteurs d'entrée CD81 et SCARB1 du VHC [294, 361]. En effet, la forme soluble de l'ecto-domaine E2 appelée sE2 est dépourvu de la partie transmembranaire de E2 et généralement tronquée au niveau de l'acide aminé 661 [362]. Bien qu'il soit sécrété sous une forme non-associée à E1, sE2 possède une conformation protéique semblable aux immunoglobulines lui permettant d'interagir avec les récepteurs d'entrée [151, 361]. Par ailleurs, des études montrent que sE2 est un agoniste des particules VHCcc pour les récepteurs membranaires [363]. Cependant, ce modèle ne reflète pas l'infection naturelle par le virus du VHC.

2.6- Les particules virales infectieuses produites en culture cellulaire VHCcc

Après des travaux de collaboration, trois laboratoires sont parvenus à créer un système efficace de culture cellulaire pour étudier le cycle complet du VHC mais l'histoire retient principalement les travaux du virologue Wakita au Japon. [51, 364, 365]. En effet, ce dernier a isolé un clone de taille complète de l'ARN du VHC (la souche JFH1) dans le sérum d'un patient japonais VHC+ (32 ans, génotype 2a) qui avait développé une hépatite fulminante. L'ARN ainsi isolé a d'abord été amplifié par RT-PCR puis séquencé afin de déterminer le génome entier. Ils ont ainsi montré que la séquence du JFH1, long de 9678 nucléotides était constituée d'un large cadre ouvert de lecture codant pour 3033 acides aminés [51]. La transfection de ce réplicon subgénomique de taille complète dans les cellules Huh7 a donné un cycle viral complet aboutissant à la production de particules virales infectieuses produites en culture cellulaires appelées VHCcc [51]. Leurs études ont montré que les VHCcc étaient capables d'infecter et de se répliquer dans les hépatocytes primaires, les lignées d'hépatomes, les souris humanisées et les chimpanzés [366]. De plus, les virions excrétés sont hautement infectieux et ne présentent aucune mutation adaptative du génome. Par ailleurs, dans la même étude, ils ont montré que les particules virales pouvaient être neutralisées par l'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre la gp E2 [51].

L'infectivité des lignées cellulaires a été augmentée grâce au développement de lignées hautement permissives (exemple : Huh7.5) [367]. Par ailleurs, ce modèle a servi à la construction de nombreuses chimères (J6/JFH1, Jc1, etc.) [177, 368]. L'utilisation du modèle VHCcc permet l'étude de tous les aspects du cycle viral. Ce modèle possède tout de même certaines limites. En effet, il est dépendant des lignées d'hépatomes qui ne reflètent pas la physiologie de la cible naturelle de l'infection virale : l'hépatocyte primaire. Néanmoins, ces modèles expérimentaux demeurent des

matériaux essentiels pour effectuer des études virologiques, développer des vaccins ou élaborer des traitements antiviraux efficaces.

Le tableau 7 résume les spécificités de chaque modèle utilisé pour l'analyse *in vitro* du VHC.

Modèles <i>in vitro</i>	Spécificités
VHCser	-Dérivés de séra des patients -Presque pas de production de virions infectieux
VHC-LPs	-Semblables aux VHCser -Etude de la fonction des peptidases-signal cellulaire
VHCpp	-Etudes mes mécanisme d'entrée du VHC -Evaluation du rôle des glycoprotéines E1 et E2
sE2	-Premier modèle d'étude des récepteurs du VHC -Ne reflète pas l'infection naturelle du VHC
Les Réplicons	-Faible taux de réplication. - Faible production de particules virales infectieuses -Taux élevé de mutations adaptatives
VHCcc	-Etude du cycle viral complet en culture cellulaire -Forte production de particules virales infectieuses sans mutations adaptatives -Modèle très dépendant de lignée d'hépatomes

Tableau 7 : Spécificités et particularité des modèles utilisés pour l'étude *in vitro* du VHC.
D'après Laurissa Ouaguia, 2015.

3 - Avantage de l'utilisation du modèle VHCcc pour nos études

Dans le cadre de notre collaboration avec les docteurs Wychowski Czeslaw et Jean. Dubuisson et avec l'accord du Pr. Wakita (*Material transfert agreement 2008*), nous avons obtenu l'autorisation d'utiliser les particules VHCcc produites en culture cellulaire après transfection du JFH1. L'avantage principal de ce modèle est qu'il représente le seul modèle disponible actuellement permettant d'étudier le cycle viral complet. De plus, il possède un fort taux de production de particules virales infectieuses, totalement dépourvues de mutations adaptatives et donc reflétant au mieux le virus de l'hépatite C dans la circulation périphérique [51].

II- TRAITEMENTS DE L'HEPATITE C

1- Histoire et évolution des traitements

Le génome du VHC subit d'importants changements évolutifs pour résister aux pressions de sélection exercées par l'organisme hôte et par les médicaments antiviraux. Par conséquent, la variabilité génétique du VHC est perçue comme un déterminant majeur de la persistance du virus et comme la cause principale des problèmes de résistances rencontrés au cours du traitement. De plus, la grande pathogénicité du VHC est principalement due au fait qu'il n'existe pas de vaccin [369]. Néanmoins, avec la compréhension grandissante de l'infection naturelle par le VHC et afin d'observer une réponse virologique soutenue chez les patients, tout en réduisant les effets secondaires des molécules anti-virales, des traitements de plus en plus efficaces ont graduellement vu le jour [370-373]. Dans un premier temps, il y a eu l'utilisation de la molécule Interféron alpha qui a été associée plus tard à la ribavirine [374, 375]. A cause des effets très limités de cette bithérapie, en particulier pour le génotype 1, des inhibiteurs de protéases virales (Boceprévir et Télaprevir) ont été développés pour être utilisés en trithérapie [376]. Le développement de ces molécules a permis d'augmenter significativement la réponse des patients. Néanmoins, ces molécules ont engendrés de nombreuses résistances. Ainsi, depuis le début de l'année 2014, de nombreux pays occidentaux ont approuvé l'utilisation de nouvelles molécules anti-virales à action directe en bithérapie, trithérapie ou quadrithérapie [373]. La figure 22 présente une étude prospective de l'histoire de l'évolution du traitement de l'hépatite C.

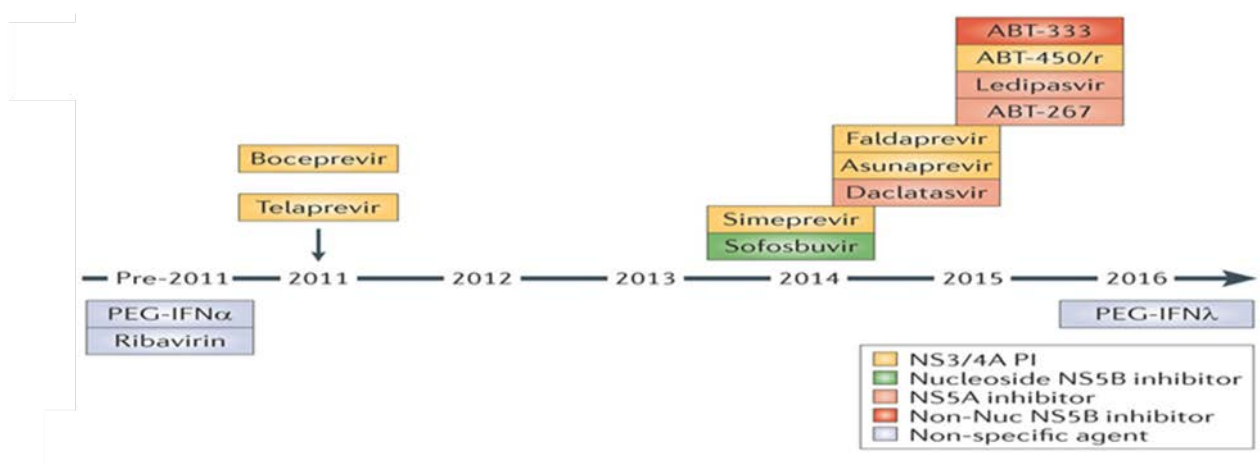


Figure 22 : Histoire de l'évolution des traitements depuis la découverte du VHC.

1990-fin 2010 : double thérapie par association de l'interféron et de la ribavirine (IFN+RBV).

2011 : trithérapie associant l'interféron +ribavirine+inhibiteurs de protéases virales (IFN+RBV+IP).

2014 : Autorisation temporaire d'utilisation des nouvelles molécules anti-virales orales (DAAs).

2014-à nos jours : développement et autorisation temporaires d'autres molécules anti-virales orales. D'après Manns, M et al, Nat rev drug discovery, 2013.

2- Les anciens traitements de référence: IFN-PEG / RBV

Depuis sa découverte et pendant plusieurs décennies, l'infection par le VHC ne pouvait être traitée qu'avec des injections d'interféron humain recombinant (2a ou 2b), molécule anti-virale à large spectre [377]. Cette molécule étant rapidement dégradée dans le corps, sa demi-vie a été augmentée par l'ajout d'un motif polyéthylène glycol à l'extrémité de l'IFN (pégylation) [378]. Cependant, le traitement IFN-PEG a été inefficace pour la majorité des patients, s'accompagnant généralement de nombreux effets secondaires [254]. En effet, seul 1/5 des patients développaient une réponse virologique soutenue (SVR) se manifestant par des taux d'ARN viraux indétectables dans le sang périphérique après le traitement [379]. De plus, certains génotypes viraux (génotype 2 et 3) répondaient mieux que d'autres (génotype 1 et 4) [380]. Afin d'accroître l'efficacité de cette molécule anti-virale, un analogue nucléosidique de la guanosine : la ribavirine a été rajouté au traitement IFN dès 1998 [381, 382]. Cette combinaison IFN-PEG+RBV a été utilisée en tant que traitement standard et les résultats ont montré que cette combinaison, pendant les 12 premiers mois du traitement, augmentait de 40% la réponse virologique soutenue en augmentant l'élimination du virus [375, 383]. Néanmoins, de nombreuses études ont souligné le développement de résistances favorisant la progression de la pathologie [374]. De plus, l'administration de l'IFN a provoqué de nombreux effets secondaires tels que anémie, élévation créatinine, désordre psychiatriques, troubles gastriques, etc. [384]. Ainsi, la recherche de l'amélioration des conditions de vie des patients a conduit au développement des inhibiteurs de protéases virales sous forme de traitements antiviraux à action directe (DAA).

3- Les traitements DAA de 1^{ère} génération : les inhibiteurs de protéases BOC/TVR

L'année 2011 peut être considérée comme l'année du premier essor dans le traitement de l'hépatite C. En effet, c'est l'année de l'utilisation des deux premières molécules anti-virales à action directe. Ces premières DAAs étaient constituées des inhibiteurs de protéases du VHC que sont le télaprevir (inhibiteur de la protéase NS3/4A) et le boceprévir (inhibiteur du NS3) [376]. En effet, dès 2003, de premières études avaient mis en évidence l'importance de l'utilisation des inhibiteurs de protéases virales dans la réduction de la charge virale mais ce n'est qu'en 2011 qu'ils ont reçu l'autorisation de mise sur le marché [385]. Ces molécules ont été utilisées sous forme d'une trithérapie en combinaison avec l'IFN-PEG+RBV. Dès lors, cette trithérapie (IFN-PEG+RBV+BOC/TVR) a servi de traitement de référence chez les malades infectés par les génotypes résistants aux traitements de première génération tel que le génotype 1b (majoritaire en France) [386]. Cette trithérapie a permis une augmentation du taux de réponse virologique soutenue de 20 à 25% par rapport à la bithérapie [387]. Néanmoins, cette trithérapie s'est révélée moins

efficace chez les autres génotypes (génotype 3) [388]. De plus, du fait de l'association de l'IFN-PEG+RBV, de nombreux effets secondaires tels que des anémies et des réactions cutanées sévères ont été rapportées [389]. Par ailleurs, l'utilisation de ces inhibiteurs s'est révélée très complexe, en particulier chez les malades ayant des facteurs de risque aggravant. Enfin, des études ont décrit l'apparition de nombreuses mutations du génome caractéristiques de la résistance à ce traitement (polymorphisme de NS3 : Q80K) [390].

4- Les traitements DAA de 2nde génération : Sofosbuvir, Lédipasvir, Daclatasvir

L'année 2014 est perçue par beaucoup comme l'année amorçant le déclin de l'épidémie associée au VHC. En effet, elle a vu le développement et l'utilisation de nouvelles molécules anti-virales. Il s'agit de médicaments oraux qui ont, une meilleure puissance anti-virale, une activité pluri- ou pan-génotypique, un meilleur profil de résistance, une meilleure tolérance et un mode d'administration moins contraignant que les thérapies existantes [391]. En fonction du génotype, ces molécules ont été utilisés, d'une part, en association avec IFN-PEG+RBV et, d'autre part, dans des combinaisons sans IFN [392]. Ce sont : des inhibiteurs de protéases NS3/4A de 2^{ème} générations (simeprévir, Asunaprévir, MK 5172, etc.) ; des inhibiteurs de la protéine NS5A (Lédipasvir, Ombitasvir, Daclatasvir, etc.) ; des inhibiteurs de la cyclophiline (Alisporivir, SCY-635) ; des antagonistes du mir122 (Miravirsén) ; des inhibiteurs non nucléosidiques de la polymérase NS5B (Dasunabuvir, Lomibuvir, etc.) et des inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de NS5B (Sofosbuvir, Méricitabine, etc.) [393, 394].

En tant qu'inhibiteur spécifique de la polymérase NS5B du VHC, le Sofosbuvir (SOF) est présenté comme l'un des traitements les plus révolutionnaires de l'hépatite C [395]. En effet, des études montrent que l'utilisation de la trithérapie IFN+RBV+SOF dans le traitement de 12 semaines chez des patients naïfs atteints d'une hépatite chronique C (génotype 1, 4, 5 ou 6) conduit au développement d'une réponse virologique soutenue dans 90% des cas, 12 ou 24 semaines après l'arrêt du traitement et environ 80% en cas de cirrhose [396, 397]

Ainsi, ces DAAs conduisent au développement de SVR très élevées chez les patients portant pratiquement tous les génotypes [382]. Par ailleurs, ils seraient également efficaces chez les patients transplantés [398]. La limite majeure actuelle de ces traitements est leur coût. En effet, les prix très élevés (SOF : environ 14 000 euros/mois) constituent la principale limite à leur généralisation, en particulier dans les pays les plus touchés [399, 400]. Par ailleurs, ces traitements de 2nde génération n'auraient que des effets moindres sur la prévention de la fibrose hépatique, de la cirrhose ou de la

survenue d'un cancer hépatique d'où une persévérance des recherches dans l'espoir de développer le médicament parfait ou la découverte d'un vaccin.

5- Les traitements en cours de développement : vers le « Perfectovir »

Les nouvelles molécules anti-virales, ciblant l'hépatite C, montrent un effet certain sur la charge virale mais des effets mitigés sur la progression de la maladie hépatique [401]. Ainsi, les prochaines décennies s'annoncent cruciales dans le contrôle de l'hépatite C [391]. En effet, l'objectif final est le développement de molécules anti-virales, administrées par voie orale, qui pourront être utilisées sans interféron pour traiter les patients non répondeurs ou naïfs [391, 402]. Ainsi, le traitement parfait de l'hépatite C, qui peut être appelé « *Perfectovir* » devra posséder les attributs suivants : administration orale, dosage simple, taux d'efficacité élevé (>95%) même lors des cirrhoses décompensées, meilleure tolérance et toxicité minimale, résistance virale minimale, meilleure activité pan-génotypique, durée de traitement limitée, interactions limitées avec d'autres traitements mais surtout avoir un prix abordable [391]. La figure 23 présente une classification des traitements actuels et futurs de l'hépatite C en fonction du taux d'efficacité et du niveau de tolérance.

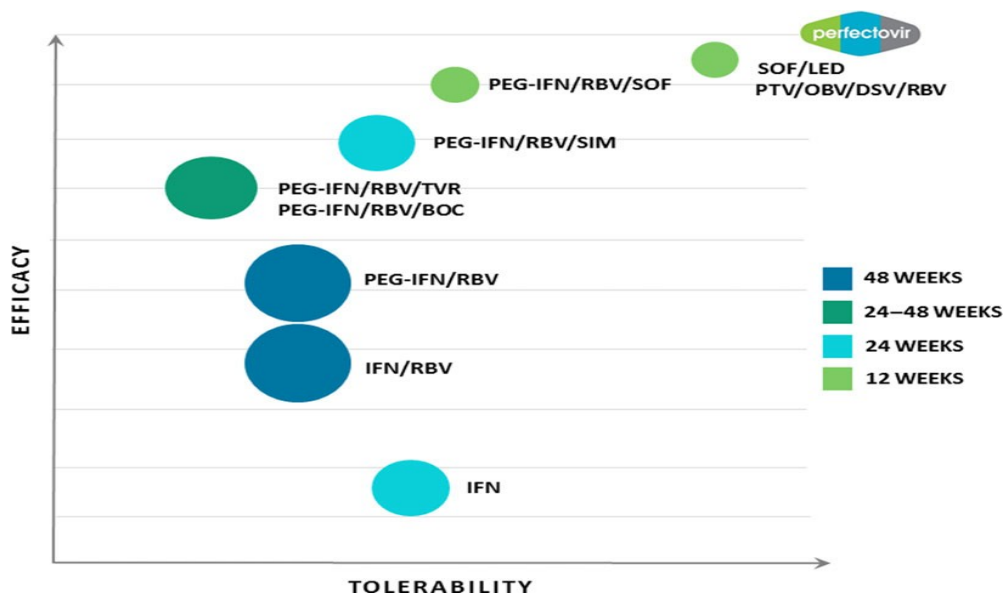


Figure 23 : Classification des traitements actuels et futurs de l'hépatite C en fonction de l'efficacité et du niveau de tolérance. L'IFN possède une faible efficacité et une faible tolérance. L'association de la RBV a diminué la tolérance mais a augmenté l'efficacité du traitement. La trithérapie IFN-PEG+RBV+BOC/TVR a crucialement augmenté l'efficacité mais a considérablement diminué la tolérance. L'utilisation récente des DAAs de 2^{ème} génération (SOF et SIM) et plus encore, leur association augmente fortement l'efficacité du traitement et la tolérance. D'après Dore, G et Feld, *J. Clin Infect Dis* 2015.

Par ailleurs, de nombreux travaux se penchent sur la recherche d'un vaccin contre l'hépatite C. En effet, la vaccination resterait le seul moyen efficace de prévenir l'apparition d'une pathologie. A cet effet, en 2006, une première étude a montré qu'il était possible d'induire une immunité efficace contre des souches modifiées du VHC, notamment en stimulant la réponse immunitaire cellulaire [403]. En outre, d'autres études ont développé un vaccin humain en utilisant des vecteurs d'adénovirus de chimpanzé associé aux vecteurs MVA (modified vaccina Ankara). Ces travaux montrent que l'administration initiale du vaccin suivi par des phases de « boosts », permet d'obtenir une réponse immunitaire T mémoire spécifique du VHC [404]. Par ailleurs, d'autres études développant des vaccins sur la base des chimères des glycoprotéines d'enveloppe du VHC semblent donner des résultats similaires [405]. Quoiqu'il en soit, la réponse aux traitements antiviraux ou la réponse aux vaccins est fortement influencée par des facteurs intrinsèques au virus et par des facteurs immunologiques.

6- Les facteurs influençant la réponse immunitaire

6.1- Les facteurs virologiques

L'efficacité des traitements antiviraux est clairement intrinsèque à de nombreux facteurs viraux car des études montrent que les protéines virales peuvent moduler la signalisation cellulaire afin de favoriser la persistance du virus [82]. En effet, par ses interactions avec l'apoA, avec le TNFR et avec le LTbR, la protéine Core favorise le développement du CHC [82, 130, 131]. En outre, Core possède une activité immunosuppressive car elle peut inhiber la prolifération des cellules immunitaires activées grâce à des interactions avec le gC1qR, induire l'apoptose des lymphocytes T, diminuer la capacité de présentation des cellules présentatrices d'antigènes, favoriser l'expansion et l'activation des lymphocytes T CD4+ régulateurs et favorise la chronicité de l'infection virale [121, 122, 123][132]. Par ailleurs, Core favorise le développement de la réponse Th17 en inhibant la différenciation des cellules dendritiques, en augmentant la sécrétion d'IL-6 et en favorisant la sécrétion de la TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) [133, 134]. D'autres études montrent que la protéine NS3 peut bloquer la capacité des cellules hôtes à stimuler la réponse immunitaire innée [183]. En effet, le complexe NS3/NS4A clive TRIF et CARDIF et inhibe la réponse anti-virale (voir figure 14) [184]. De plus, NS3 inhibe la transduction du signal induisant la synthèse de l'IFN de type I *via* le facteur IRF-3 [186]. Par ailleurs, NS3 dérégule certaines fonctions biologiques et favorise la carcinogenèse [191]. Enfin, de nombreuses études signalent l'implication de la protéine NS5A dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-virale et dans la carcinogenèse virale C [216, 222].

Certaines études ont suggéré que le génotype viral pourrait également influencer la sévérité de la maladie [406]. Cependant, la majorité des études s'accorde pour dire que les facteurs influençant la progression de la maladie sont principalement ceux liés à l'hôte tels que l'âge avancé, le sexe masculin, les co-morbidités et la spécificité de la réponse immunitaire [65].

6.2- Les facteurs liés à l'hôte

L'âge joue un rôle important dans l'évolution de l'hépatite C. En effet, un âge supérieur à 40 ans au moment de la contamination favorise la progression vers la fibrose et le développement des complications [406]. Par ailleurs, les cirrhoses et les CHC dues au VHC semblent plus fréquentes après 60 ans [406]. De plus, le sexe masculin serait aussi un facteur de risque de l'hépatite C. En effet, des études montrent que la vitesse de progression de l'hépatite C est plus importante chez les hommes que chez les femmes [406]. En effet, les œstrogènes possèdent des propriétés anti-fibrosantes qui ralentissent la progression vers la fibrose [407]. D'autres facteurs tels que la surcharge en fer, la consommation excessive d'alcool, les co-infections et le syndrome métabolique aggravent l'hépatite C [408]. En outre, de nombreuses études montrent que la progression de l'hépatite C est également associée au polymorphisme de l'interleukine 28B (IL-28B) qui code pour l'interféron- λ 3 (IFNL3). Elle est impliquée dans la réponse innée anti-virale et elle joue un rôle primordial dans la clairance virale chez les patients [409]. En effet, les patients possédant un génotype défavorable de l'IL-28B (allèles CT ou TT) ont une probabilité plus importante d'évoluer vers la chronicité [408]. Enfin, les facteurs immunologiques sont très déterminants au cours de l'infection aiguë par le VHC, pour l'éradication spontanée du virus, qui survient dans 10-50% des cas [35]. Parmi ces facteurs, la vigueur, la rapidité et le caractère multi-spécifique des réponses immunes humorales et cellulaires sont mieux associés à l'élimination spontanée du virus [410].

III- LE SYSTEME IMMUNITAIRE

A/ LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LES LYMPHOCYTES T

1- Généralités

La réponse immunitaire est un acteur essentiel dans la défense de l'organisme contre les infections virales. En effet, le système immunitaire a pour rôle de maintenir l'intégrité biologique de l'organisme notamment (i) par la reconnaissance et la tolérance du soi mais surtout (ii) par la reconnaissance et l'élimination des pathogènes [411]. Pour assurer ce rôle, le système immunitaire est constitué d'un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance qui discriminent les molécules du « soi » et du « non-soi ». L'établissement des lignes de défenses efficaces contre les infections virales nécessite la mise en jeu d'une diversité importante de cellules. La première ligne de défense, appelée réponse immune innée, est non spécifique et repose sur l'action des cellules NK (natural killer), des neutrophiles, des macrophages, des molécules du complément et des lectines [411, 412]. Ces cellules possèdent des récepteurs PRR (pattern recognition receptor) capables de reconnaître les motifs conservés des pathogènes (PAMP) et de les éliminer, principalement à travers des mécanismes de phagocytose et de sécrétions importantes des facteurs ou cytokines inflammatoires [413]. Après l'activation de la réponse immune innée, les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques) opsonisent le pathogène viral afin de présenter des antigènes viraux spécifiques aux cellules lymphocytaires : c'est l'activation de la réponse immune spécifique dite adaptative [411]. Cette dernière est caractérisée par la reconnaissance spécifique d'épitopes antigéniques et la création d'une mémoire immunologique [414]. Les lymphocytes T et B constituent les deux axes principaux de la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale qui joue un rôle central dans la neutralisation des particules infectieuses par les anticorps spécifiques des protéines virales [415]. Quant aux lymphocytes T, ils se coordonnent, orchestrent et exécutent les réponses immunitaires dirigées contre les agents pathogènes.

2- Ontogenèse des lymphocytes T

Les lymphocytes T occupent une place centrale dans l'immunité adaptative. Ils dérivent de cellules souches hématopoïétiques CD34+ qui naissent dans la moelle osseuse, migrent vers le thymus pour maturer et donner des lymphocytes T fonctionnels [416, 417]. Au cours de

l'ontogenèse dans la moelle osseuse, une cellule souche hématopoïétique donnera au choix un progéniteur myéloïde commun (origine des cellules de l'immunité innée) ou un progéniteur lymphoïde commun. Ce dernier est une cellule pluripotente capable de générer trois lignages lymphoïdes (B, T et NK) selon les signaux qu'il recevra. Lorsque le progéniteur lymphoïde génère un lignage T, la cellule précurseur quitte la moelle osseuse et migre vers le cortex du thymus pour y poursuivre son processus de différenciation [418]. Le passage dans le thymus permet aux précurseurs lymphoïdes de se développer pour donner naissance à des lymphocytes T matures dit « naïfs ». La production journalière est estimée à environ $1,3 \times 10^9$ pour les lymphocytes T CD4 et à $2,1 \times 10^9$ pour les lymphocytes TCD8 [419]. Lors de ce développement, les lymphocytes immatures appelées thymocytes migrent du cortex vers la medulla et subissent un certain nombre de modifications phénotypiques caractérisés par des réarrangements de TCR et aboutissant à la formation d'un pré-TCR puis d'un TCR mature permettant aux thymocytes d'interagir avec les autres cellules du thymus (cellules épithéliales et cellules dendritiques), le but final étant de produire des lymphocytes T susceptibles de reconnaître des antigènes [417]. Ce processus est très drastique car seul 2% d'entre eux sortent du thymus pour constituer le pool périphérique de lymphocytes T matures.

On distingue deux populations majeures de lymphocytes T : les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes T $\alpha\beta$. Les Lymphocytes T $\gamma\delta$ ou LT $\gamma\delta$ représentent 1-10% des lymphocytes T totaux. Ils sont essentiellement localisés dans le sang, la peau et les muqueuses où ils exercent principalement une activité cytotoxique anti-tumorale [420]. Quant aux lymphocytes T $\alpha\beta$ (T $\alpha\beta$), ils sont majoritaires dans l'organisme et sont principalement constitués de lymphocytes T CD4+ (dits auxiliaires) et de lymphocytes T CD8+ (dits cytotoxiques) [417]. En effet, la différenciation thymique des lymphocytes T est dirigée par l'expression spécifique des récepteurs de surface (CD4, CD8, CD25, CD44, etc.) [421]. Sur la base de l'expression des marqueurs CD4, CD8, CD3 et CD44, on peut diviser le processus de maturation des LT en quatre étapes majeures : le stade double négatif 1 (DN1), le stade double négatif 2 (DN2), le stade double positif (DP) et le stade simple positif (SP) (voir figure 24) [422]. Le premier stade ou stade DN1 est caractérisé par des thymocytes pluripotents qui n'expriment ni le CD4 ni le CD8. Ce stade peut donner naissance à des lymphocytes T, des lymphocytes NK et des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Des études ont montré que ces LT doubles négatifs pour le CD4 et le CD8 pouvaient exprimer le CD44 et le CD25 et quelques fois le FOXP3 [423]. Par la suite, on a le stade DN2 est caractérisé par des thymocytes pro-T CD4-CD8-CD25+CD44+ pouvant générer lymphocytes T et des lymphocytes NK mais incapables de se différencier en cellules dendritiques. La transition DN1 à DN2 s'accompagne généralement d'une prolifération importante des thymocytes qui est dépendante de l'IL-7 [424]. On

distingue ensuite le stade DP constitué de thymocytes pro-T CD4+CD8+CD3+CD25+CD44-. C'est le stade à partir duquel on note l'expression du complexe TCR-CD3. Enfin, le stade SP caractérisé par des lymphocytes CD3+ qui ont perdu l'expression d'un récepteur et donc qui exprime soit le CD4 soit le CD8 (voir figure 24) [425, 426]. La figure 24 décrit les principales étapes de maturation des lymphocytes T dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique CD34+, puis dans le thymus.

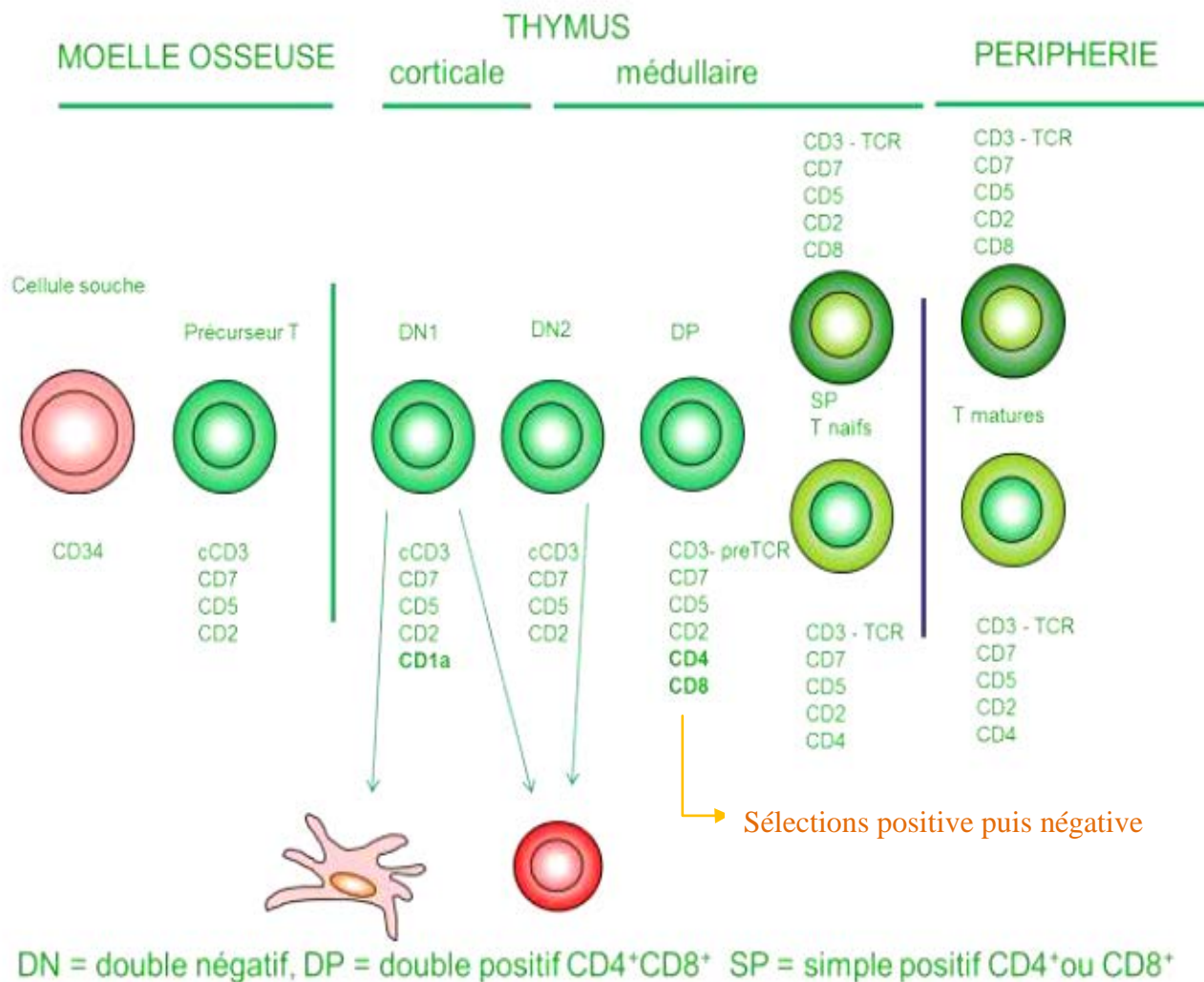


Figure 24: Ontogénèse des lymphocytes T. En fonction de l'expression des marqueurs CD4, CD8, CD25 et CD44, on distingue 4 étapes de maturation des LT dans le thymus. Dans l'ordre d'apparition, on a le stade DN1 constitué des thymocytes CD4-CD8- CD44+ ; Le stade DN2 constitué des thymocytes pro-T CD4-CD8-CD25+CD44+ ; Le stade DP constitué des thymocytes pro-T CD4+CD8+CD3+CD25+CD44- et le stade SP constitué de lymphocytes qui expriment soit le récepteur CD4, soit le récepteur CD8. Adapté de Guy Gorochov et al, Thèse de doctorat en Sciences médicales, 1997.

3- Sélection thymique des lymphocytes T CD3+

En parallèle de ces modifications phénotypiques, les thymocytes fabriquent les chaînes du TCR par réarrangement des gènes. Les segments génétiques utilisés sont situés sur les chromosomes 14 (répertoires TCR γ et δ) et le chromosome 7 (répertoires TCR α et β). On distingue des segments de type V (Variable), D (Diversité) et J (Jonction) pour les chaînes β et γ et les segments V J pour les chaînes α et δ [427]. On note ainsi, des réarrangements de type V (D) J, semblables à ceux des immunoglobulines, au cours de la différenciation des thymocytes. Ces réarrangements sont dirigés par les enzymes RAG (Recombination Activating Gene) qui sont capables de cliver l'ADN [428]. Si l'on tient compte des 3 segments V, D et J pour les deux chaînes α et β , on aboutit ainsi à la production d'un large répertoire de lymphocytes T $\alpha\beta$ capables de reconnaître spécifiquement une grande diversité de pathogènes [429]. Les réarrangements des chaînes V (D) J conduisent donc à l'expression de TCR à la surface des thymocytes. Ces TCR vont reconnaître des structures antigéniques présentées par les autres cellules du thymus. Cette reconnaissance est indispensable à la délivrance de signaux de survie ou de mort cellulaires. En fonction de ces signaux, les thymocytes pro-T subiront différentes étapes de maturation aboutissant à la sélection des lymphocytes exprimant un TCR fonctionnel et non susceptibles d'induire des phénomènes d'auto-immunité en périphérie [430]. Ces étapes de maturations sont par ordre d'apparition : la β -sélection, la sélection positive et la sélection négative (voir figure 25).

La β -sélection est la première à survenir. Elle se caractérise par un réarrangement VDJ de la chaîne β qui donne naissance à des thymocytes immatures exprimant un TCR incomplet (pré-TCR) car non associé au TCR α [431]. Ce pré-TCR transmet des signaux de survie et de prolifération aux thymocytes mais plus de 90% des cellules qui arrivent à ce stade meurent du fait de l'absence d'expression de pré-TCR à leur surface. De plus, des études récentes ont montré que cette sélection était dirigée par les facteurs pontin (chromatin remodeling factor) et FADD (Fas-associated protein with death domain) [432].

La sélection positive se déroule au stade DP chez des thymocytes CD4+CD8+CD3+ exprimant un TCR (voir figure 24). Ce TCR reconnaît des antigènes du soi présentés par les cellules épithéliales du cortex thymique. Les thymocytes dont le TCR ne reconnaît pas le complexe CMH-peptides du soi ne reçoivent pas de signal de survie et meurent [433]. Cette étape permet l'élimination d'un grand nombre lymphocytes T impropres à collaborer avec les molécules HLA (CMH humain) de l'hôte. Des études récentes montrent que cette sélection positive est dépendante de 2 protéine RCAN 1 et 3 (Regulators of Calcineurin) [433].

Par la suite, les cellules dendritiques de la zone corticale du thymus présentent des antigènes du soi aux thymocytes ayant survécus à la sélection positive [434]. Les thymocytes qui reçoivent un

signal trop fort *via* leur TCR seront éliminés par délétion clonale (apoptose) ou par inactivation fonctionnelle (anergie): c'est la sélection négative [435]. Les cellules qui reçoivent un signal modéré *via* leur TCR deviendront des Treg tandis que celles ne recevant aucun signal de leur TCR deviendront des cellules T naïves [423]. Ce processus de sélection permet d'éviter le développement de cellules auto-réactives. De nombreuses études montrent que ce processus est régulé par la protéine AIRE (Auto-immune REgulator) présente dans les cellules épithéliales thymiques médullaires et indispensable à l'expression ectopique d'antigènes [436].

Ces étapes de sélection des thymocytes aboutissent à la formation de lymphocytes T naïfs simple positifs CD4+ ou CD8+ qui quittent le thymus vers le sang et colonisent les organes lymphoïdes secondaires. La figure 25 est une schématisation du processus de différenciation thymique des lymphocytes.

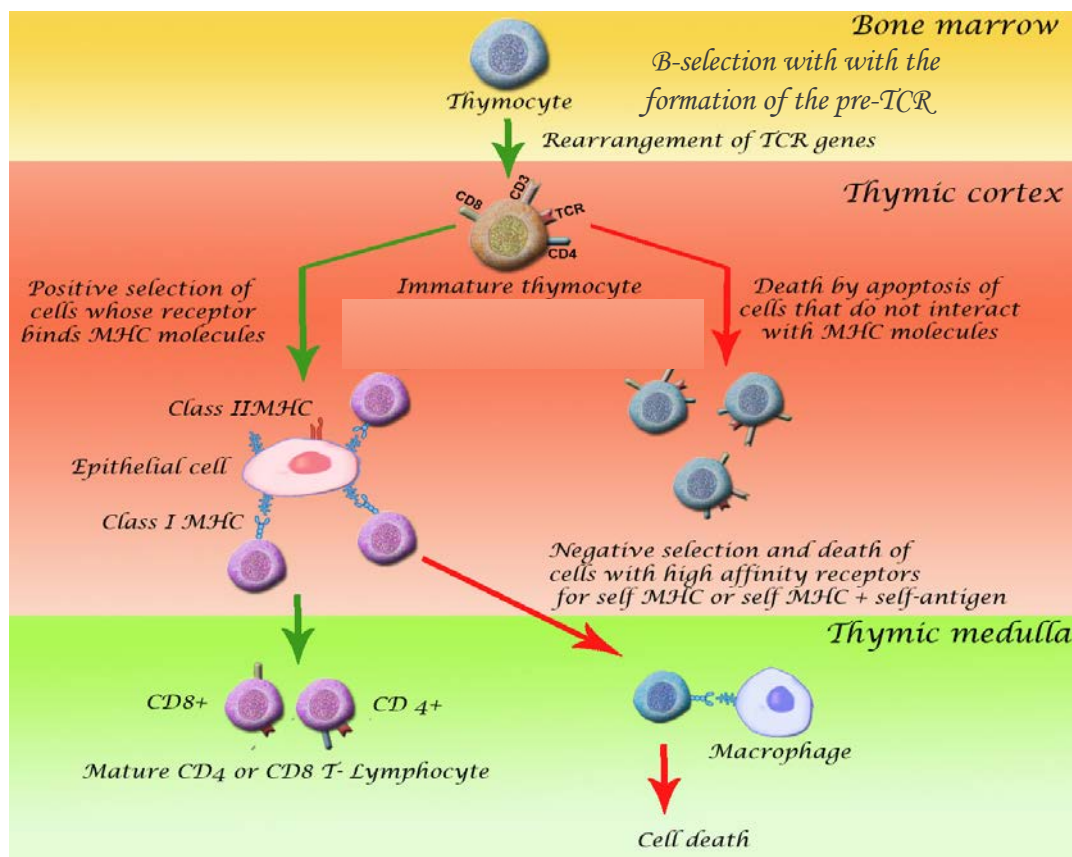


Figure 25: Schématisation du processus de différenciation thymique des lymphocytes T. L'initiation du réarrangement des gènes du TCR débute dans la moelle osseuse (partie jaune) mais ce réarrangement est essentiellement effectué dans le cortex du thymus avec l'apparition du TCR-CD3. Les thymocytes immature double positifs CD4+CD8+ subissent une sélection positive et seuls survivent les cellules dont le TCR interagit avec les antigènes du soi présentés sur des molécules de CMH. Les thymocytes qui survivent subissent une nouvelle sélection négative conduisant à la destruction des cellules dont le TCR possède une trop forte affinité pour les antigènes du soi (partie rouge). La sélection négative débute dans le cortex et se poursuit dans la médulla. Cette sélection thymique aboutit à la production de lymphocytes T simple positifs CD4+ ou CD8+ (partie verte). Adapté de Honda Civic Hatchback, 2013.

Malgré l'efficacité de la sélection thymique, des lymphocytes T pouvant reconnaître des antigènes du soi peuvent échapper à cette double sélection et se retrouver dans la circulation sanguine ou dans les tissus lymphoïdes secondaires [437]. En effet, des études ont décrit la présence de lymphocytes T CD4+ auto-réactifs dans le foie de certains patients [437]. Afin de palier à cet échappement, le système immunitaire a mis en place des mécanismes de tolérance périphérique actifs assurés par les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ (Treg) [438]. Enfin, la sélection thymique aboutit à la production de lymphocytes simples positifs T CD4+ ou T CD8+ qui sont dits naïfs car ils n'ont jamais été en contact avec l'antigène dont ils sont spécifiques. Ces LT naïfs quittent le thymus pour la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à ce qu'ils rencontrent l'antigène dont ils sont spécifiques. La reconnaissance de cet antigène va leur permettre de proliférer (expansion clonale), de se différencier et d'acquérir leurs fonctions effectrices [439].

4- Développement et organisation du récepteur à l'antigène : Le TCR

Les Lymphocytes T CD3+ jouent un rôle central dans l'immunité adaptative à médiation cellulaire. En effet, ces lymphocytes reconnaissent des motifs antigéniques (Ag) présentés à la surface des molécules de CMH par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette interaction TCR/Ag se déroule au niveau d'une zone appelée synapse immunologique [440]. Les Lymphocytes SP CD8+ reconnaissent des antigènes présentés par les molécules de CMH de classe I tandis que les lymphocytes SP CD4+ reconnaîtront les antigènes présentés par les molécules de CMH de classe II [441, 442]. Pour reconnaître ces motifs antigéniques, les LT utilisent un récepteur spécifique appelé récepteur d'antigène des lymphocytes T ou TCR (T Cell Receptor) [442]. Le TCR des lymphocytes T CD3+ est composé de deux chaînes transmembranaires α et β ayant une composition peptidiques de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines. En effet, ils possèdent des structures similaires composées des segments VDJ (chaînes β) et des segments VJ (chaînes α) [427]. Par ailleurs, le TCR possède aussi un domaine transmembranaire hydrophobe et un court domaine cytoplasmique et l'association des deux chaînes α et β se fait par un pont disulfure [443]. La présence du TCR seul est insuffisante pour le transfert des informations quantitatives et qualitatives liées à l'antigène. En effet, le TCR ne possède pas de domaine cytoplasmique et une association aux molécules du CD3 est nécessaire [444, 445]. En effet, les portions cytoplasmiques du CD3 permettent d'initier la signalisation cellulaire grâce à leur motifs ITAMs (Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif) où sont localisés des résidus de tyrosine, cibles de la phosphorylation par des protéines kinases spécifiques à l'origine de la transduction d'un signal d'activation [444]. Des études ont montré qu'il existait 10 motifs ITAMs différents présent sur la molécule CD3. Ces

motifs participent à l'activation des LT et favorisent la réponse immune [446]. Le complexe TCR/CD3 ainsi formé induit les voies initiale de transduction du signal, permettant l'activation de la cellule T [443]. La molécule CD3 est composée des sous-unités polypeptidiques non polymorphes δ , ϵ , γ et ζ qui s'associent de manière non covalente pour former les trois dimères (voir figure 26) [444]. La figure 26 montre l'association du TCR aux molécules du CD3.

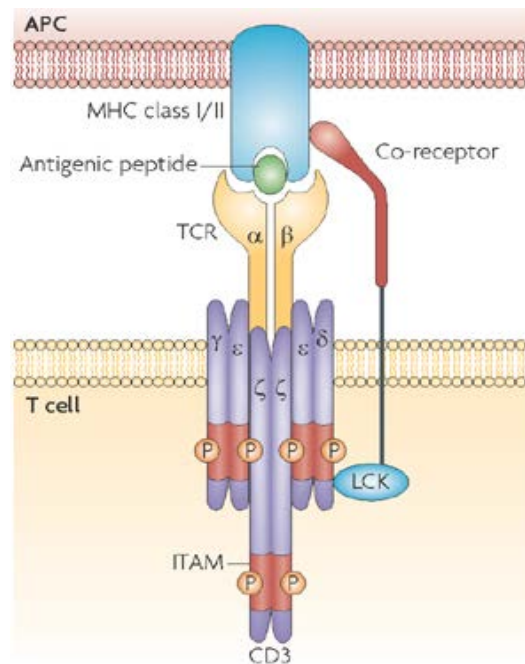


Figure 26 : Organisation du complexe TCR/CD3. Les cellules présentatrices d'antigènes présentent les motifs antigéniques *via* les molécules de CMH (en bleu). Le TCR est constitué de deux chaînes α et β (en jaune). Ce dernier reconnaît les fragments peptidiques présentés par les CMH I ou II. Les informations quantitatives et qualitatives sont ensuite transmises aux molécules du CD3 qui portant des motifs ITAM (en violet et marron). *D'après Nicolas Gascoigne, Nature Reviews Immunology 8, November 2008.*

Comme décrit ci-dessus, après la sélection thymique, les lymphocytes portent, en plus du CD3, les récepteurs CD4 ou CD8. Les molécules CD4 et CD8 sont des déterminants majeurs des lymphocytes T car elles permettent de distinguer en périphérie les lymphocytes auxiliaires (TCD4+) des lymphocytes cytotoxiques (TCD8+) [419]. Ces molécules appartiennent elles-aussi à la superfamille des immunoglobulines. CD4 et CD8 permettent de stabiliser l'interaction de CMH avec le TCR, car elle interagissent avec une partie du CMH [447]. CD4 et CD8 sont donc des corécepteurs du TCR qui participent à la signalisation intracellulaire en recrutant des kinases de type Lck ou Fyn [448].

5- Structure du complexe TCR/CD3 et transduction du signal

La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR et la participation du CD4/CD8 initient la transduction de signal aboutissant à diverses réponses immunologiques que sont la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, la sécrétion de cytokines et le développement de fonction cytotoxique. Ainsi, suite à l'interaction du TCR avec son ligand spécifique, la signalisation cellulaire est mise en place. Cette dernière peut être subdivisée en 3 étapes séquentielles. Dans un premier temps, l'activation et le recrutement rapide des protéines tyrosines kinases telles que le Lck et Fyn qui phosphorylent les tyrosines des motifs ITAM des domaines cytoplasmiques des molécules CD3 [444, 448]. Cette étape initie le recrutement et la phosphorylation de la protéine tyrosine kinase ZAP-70 (Zeta-chaine associated protein kinase 70) [449]. Par la suite, la protéine ZAP-70 recrute la protéine adaptatrice LAT (Linker for Activation of T cells). La protéine LAT phosphoryle la phospholipase Cy (PLC γ) conduisant à la formation de deux seconds messagers que sont l'IP3 (inositol triphosphate) et le DAG (diacylglycérol) [450]. Par la suite, ces seconds messagers activent les voies de signalisation des MAPKinases (ERK) et PI3Kinases (AKT) [451]. Cette activation permet l'activation des différents facteurs de transcription tels que N-FAT (Nuclear Factor of Activated T cells) et AP-1 (Activation Protein 1) qui conduisent à l'expression des gènes codants pour les cytokines et des chimiokines (voir figure 27) [451]. La figure 27 présente les mécanismes de transduction du signal dans les lymphocytes T CD3+

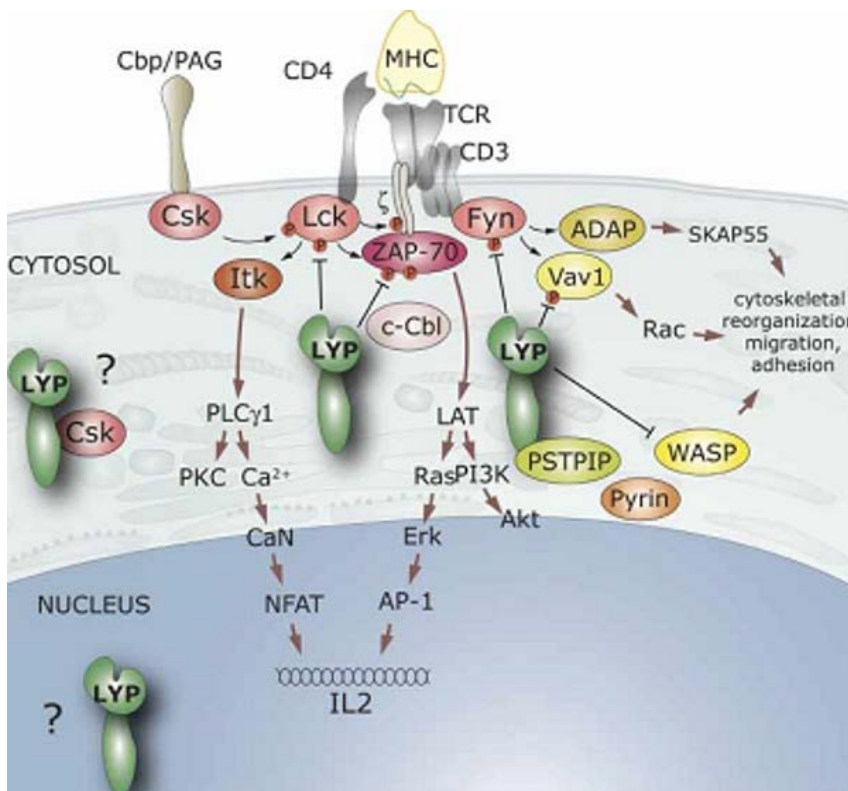


Figure 27 : Mécanismes de transduction de signal dans les lymphocytes T CD3+. La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR initie la signalisation cellulaire. Tout d'abord, les protéines tyrosines kinases telles que le Lck et Fyn sont recrutées et activées. Lck et Fyn phosphorylent les motifs ITAM du CD3. Par la suite, ZAP-70 est recrutée et phosphorylée. Cette dernière recrute la protéine LAT et active les voies de signalisation des MAPKinases et PI3Kinases, permettant l'activation des différents facteurs de transcription (N-FAT et AP-1) qui conduisent à l'expression des gènes codants pour les cytokines. *D'après Vang, T et al, Auto-immunity, 2007*

L'activation effective des cellules T nécessite trois signaux principaux [452]. Le premier signal est constitué de l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide. Le deuxième signal correspond à l'interaction des molécules de costimulation entre la CPA et le lymphocyte T (interactions CD28-CD80/86). Cette interaction stabilise le complexe TCR/CMH et amplifie le signal 1 ce qui permet l'activation de voies de signalisation distinctes : voie calcique, voie PKC et voie MAPKinases. L'activation de ces voies conduit à l'activation des facteurs de transcription (NFKB, AP1, NFAT) conduisant à l'expression de diverses cytokines (IL-2, IL-15) et récepteurs (CD25, CD154). La fixation de ces cytokines (IL-2) sur leurs récepteurs spécifiques (CD25) conduit à l'activation de la voie Pi3K/mTOR (mammalian Target of rapamycin) qui initie la prolifération des lymphocytes T : c'est le signal 3 (signal 3) [452]. La figure 28 présente l'importance des différents signaux dans l'activation d'un lymphocyte T.

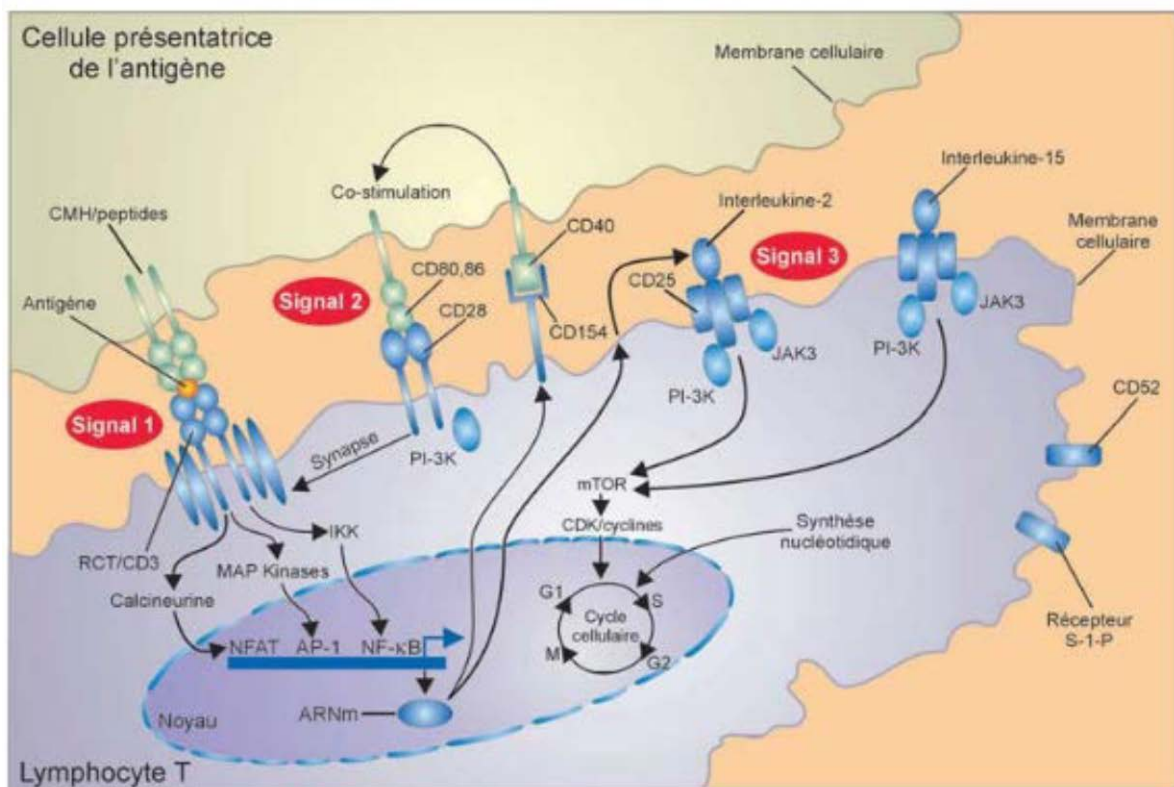


Figure 28 : Activation des lymphocytes T et implications des 3 signaux d'activation.

L'activation des cellules T nécessite trois signaux. Le premier signal (signal 1) est constitué de l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide. Le deuxième signal (signal 2) correspond à l'interaction des molécules de costimulation entre la cellule présentatrice d'antigènes et le lymphocyte T. Le signal 2 amplifie le signal 1 ce qui permet l'activation des 3 voies de signalisation (voie calcique, voie PKC et voie MAPKinase). L'activation de ces voies conduit à l'activation des facteurs de transcription (NFKB, AP1, NFAT) conduisant à l'expression de diverses cytokines (IL-2, IL-15) et des nombreux récepteurs (CD25, CD154). La fixation de ces cytokines (IL-2) sur leurs récepteurs spécifiques (CD25) conduit à l'activation de la voie Pi3K/mTOR qui initie la prolifération des lymphocytes T : c'est le signal 3 (signal 3). D'après *Halloran, 2004 The New England Journal of Medicine*.

Des études montrent que la transduction du signal dans les lymphocytes T conduit au recrutement de la protéine LAT qui à une signalisation cellulaire qui peut emprunter trois voies distinctes :

- la voie calcique : l'IP3 se fixe sur ces récepteurs à la surface du RE et induit la sortie des stocks réticulaires des ions Ca^{2+} dans le cytoplasme. Ces ions vont se fixer sur la calmoduline pour activer la calcineurine. Par la suite, la calcineurine déphosphoryle NFAT et favorise sa translocation dans le noyau. Cette translocation favorise la transcription de divers gènes tels que l'IL-2 (voir figure 28) [453].
- La voie PKC : le DAG phosphoryle la protéine kinase C (PKC) qui libère NFkB. Ce dernier est transloqué dans le noyau pour activer la transcription des gènes de diverses cytokines (voir figure 28) [454].
- La voie des MAPKinases : la protéine LAT peut également recruter la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) qui recrute à son tour la protéine GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui favorise l'activation des GTPases Ras et Rac. Ras active la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). L'activation de cette voie conduit à la phosphorylation des facteurs Erk (extra-cellular signal Regulated protein Kinase) qui sont ensuite transloqués dans le noyau [455]. En parallèle, la GTPase Rac phosphoryle le facteur JNK (c-Jun NH2-terminal Kinases) qui phosphoryle à son tour le facteur c-Jun. Ce dernier (c-Jun) s'associe à c-Fos pour former le facteur de transcription AP-1, favorisant la transcription de nombreux gènes (voir figure 28) [456]. Par ailleurs, l'engagement du TCR favorise le recrutement et l'activation de la PI3K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) qui produit phosphatidylinositol-3-phosphate (PiP), du phosphatidylinositol-3,4-phosphate (PiP2) et du phosphatidylinositol-3, 4,5-phosphate (PiP3). Ces lipides membranaires favorisent le recrutement à la membrane des protéines Akt. Ces derniers activent les facteurs de transcription responsable de la translocation nucléaire de NFAT, permettant ainsi l'expression de nombreux gènes de cytokines [457, 458].

Le tableau 8 présente la chronologie de l'expression des gènes après formation du complexe CMH/Ag-TCR.

	Gene product	Function	Time mRNA expression begins	Location	Ratio of activated to nonactivated cells
FACTEURS DE TRANSCRIPTION	Immediate				
	c-Fos	Protooncogene; nuclear-binding protein	15 min	Nucleus	> 100
	c-Jun	Cellular oncogene; transcription factor	15–20 min	Nucleus	?
	NF-AT	Transcription factor	20 min	Nucleus	50
	c-Myc	Cellular oncogene	30 min	Nucleus	20
	NF-κB	Transcription factor	30 min	Nucleus	> 10
CYTOKINES ET RECEPTEURS	Early				
	IFN-γ	Cytokine	30 min	Secreted	> 100
	IL-2	Cytokine	45 min	Secreted	> 1000
	Insulin receptor	Hormone receptor	1 h	Cell membrane	3
	IL-3	Cytokine	1–2 h	Secreted	> 100
	TGF-β	Cytokine	<2 h	Secreted	> 10
	IL-2 receptor (p55)	Cytokine receptor	2 h	Cell membrane	> 50
	TNF-β	Cytokine	1–3 h	Secreted	> 100
	Cyclin	Cell-cycle protein	4–6 h	Cytoplasmic	> 10
	IL-4	Cytokine	<6 h	Secreted	> 100
	IL-5	Cytokine	<6 h	Secreted	> 100
	IL-6	Cytokine	<6 h	Secreted	> 100
	c-Myb	Protooncogene	16 h	Nucleus	100
	GM-CSF	Cytokine	20 h	Secreted	?
Late					
HLA-DR	Class II MHC molecule	3–5 days	Cell membrane	10	
VLA-4	Adhesion molecule	4 days	Cell membrane	> 100	
VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-5	Adhesion molecules	7–14 days	Cell membrane	> 100, ?, ?, ?	

Tableau 8 : Chronologie de l'expression des gènes après formation du complexe CMH/Ag-TCR. Après engagement du TCR, les facteurs de transcription c-FOS, c-Jun, N-FAT et NFKβ sont rapidement activés (15-30 min). Leur activation conduit *in fine* à l'expression séquentielle de nombreuses cytokines telles que l'IFN-γ (30 min), IL-2 (45 min), TGF-β (~2h) ou IL-4 (~6h).

Adapté de G Crabtree, Science www.ulg.ac.be/medint/cours8.ppt.

6- Les fonctions des lymphocytes T

En fonction de l'expression des molécules CD4 ou CD8, on peut diviser les lymphocytes T CD3+ en deux populations : les lymphocytes T auxiliaires ou T helper (Th) et les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les Lymphocytes Th expriment le marqueur CD4 alors que les CTL expriment majoritairement le marqueur de surface CD8 [417, 459].

6.1- Fonction des lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ ou T cytotoxiques (CTL) sont des cellules essentielles à l'élimination des pathogènes. Ils possèdent un TCR qui reconnaît des antigènes peptidiques présentés par les molécules du CMH de classe I [441, 442]. En cas d'infection, les CPA phagocytent le virus et présentent des antigènes viraux à la surface des molécules de CMH de classe I ou II. *Via* leur TCR, les lymphocytes CD8+ ont la capacité de se reconnaître spécifiquement les motifs antigéniques présentés par le CMH de classe I. Cet engagement du TCR conduit à l'activation et à la différenciation des T CD8+ en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) [411]. Des études montrent que les CTL ont la capacité d'infiltrer des tumeurs pour éliminer spécifiquement des cellules tumorales *via* des mécanismes médiés par libération de granzymes, perforines, TRAIL et FasL [460-462]. Les CTL agissent donc principalement en induisant la cytolysse mais certaines études ont montré que ces lymphocytes sont capables de lutter contre les infections par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ ou le TNF- α [463]. Ainsi, les lymphocytes CD8+ peuvent inhiber l'angiogénèse, limiter les infections virales et inhiber la prolifération tumorale.

6.2- Fonction des lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ représentent une population lymphocytaire très hétérogène qui joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire adaptative [464]. Ils possèdent un TCR qui reconnaît des antigènes peptidiques présentés par les molécules du CMH de classe II [441]. Après stimulation antigénique, les lymphocytes TCD4+ produisent des quantités importantes de cytokines aidant la production des anticorps par les lymphocytes B, favorisant la phagocytose et favorisant l'activité des macrophages, neutrophiles, basophiles, éosinophiles et T CD8+ [464, 465]. Les T CD4+ ont donc des fonctions pleïotropes essentiellement dirigées vers la stimulation, la régulation ou l'amplification de l'activité des autres cellules immunitaires. A ce titre, les LCD4+ sont appelés

lymphocytes T auxiliaires ou T helper (Th) [465, 466]. L'engagement de TCR conduit à l'activation et à la différenciation des lymphocytes CD4+ en cellules effectrices. En fonction des facteurs de transcription et des cytokines majoritaires qui sont sécrétées, les LTCD4+ sont classés en 4 populations majoritaires que sont les lymphocytes Th1, Th2, Th17 et les lymphocytes T régulateurs (Treg) [464, 465]. Ainsi, le lignage CD4 est donc caractérisé par une grande plasticité et peut donner naissance soit à des cellules effectrices, soit à des cellules régulatrices.

a) Cellules Th1 et Th2

Au début des années 1980s, des scientifiques ont suggéré l'existence d'une diversité de cellules Th impliquées à la fois dans les réponses immunes à médiation cellulaire et humorale mais ce n'est qu'en 1982 que l'on a pu mettre en évidence les populations Th1 et Th2 qui différaient l'une de l'autre en fonction des cytokines produites [467]. Les cellules Th1 produisent des quantités importantes d'IFN- γ et d'IL-2, essentielles à l'activation des macrophages et à l'élimination des virus tandis que les Th2 produisent des quantités importantes d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 essentielles au recrutement des éosinophiles et à l'élimination des parasites [468-470]. Ces deux populations de Th vont, par leur sécrétion de cytokines, s'inhiber mutuellement, favorisant ainsi leur propre développement [471].

Le lignage Th1 est essentiellement impliqué dans les réponses dirigées contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus ou les bactéries [472]. Lorsqu'elles sont activées, les cellules Th1 sécrètent des cytokines de type pro-inflammatoires IL-2, IFN- γ , TNF- α , lymphotoxine et TNF- β [473, 474]. Des études ont montrés que les cellules Th1 agissent également sur les CPA en augmentant leur capacité de phagocytose, leur production de médiateurs pro-inflammatoires ainsi que leur capacité de présentation antigénique et d'activation des lymphocytes T naïfs [464, 465]. En outre, les Th1 peuvent être impliqués dans certaines maladies auto-immunes et maladies inflammatoires chroniques, telles que la maladie de Crohn et l'athérosclérose [475].

Les lymphocytes Th2, quant à eux, sont impliqués dans les réponses immunes dirigées contre les pathogènes extracellulaires tels que les parasites ou les schistosomes [476]. Les cellules Th2 sécrètent des cytokines de type anti-inflammatoires IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13 [475, 477]. De nombreuses études ont montré que les lymphocytes Th2 favorisent également le développement des maladies allergiques *via* l'activation des éosinophiles [478]. Par ailleurs, ces Th2 joueraient un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B et dans l'inhibition des réponses pro-inflammatoires [479].

b) Cellules Th17

Les LTCD4⁺ peuvent également se différencier en cellules Th17 qui sont des cellules pro-inflammatoires caractérisées par la sécrétion des cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 et IL-23 [474, 480]. Ces Th17 ont été mis en évidence pour la première fois en 2005 comme étant un nouveau lignage des lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-17 [481]. En effet, la non production d'IL-4 et d'IFN- γ associée à l'absence d'expression des facteurs de transcription STAT-1 et STAT-6 favorise la différenciation des précurseurs T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Th17 [482]. Des études ont montré l'importance des cytokines IL-1 et IL-23 dans le maintien de ce lignage [483, 484]. D'autres études ont montré que les cytokines IL-6 et TGF- β jouent un rôle important dans la différenciation des Th17 en induisant l'expression du facteur de transcription ROR γ t spécifique du lignage Th17 [485]. Les lymphocytes Th17 jouent un rôle dans la protection de l'hôte contre les pathogènes et dans le développement des manifestations auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose multiple [485]. Par ailleurs, les Th17 semblent également favoriser le développement des maladies inflammatoires chroniques [486]. En outre, les Th17 sont impliquées dans le développement de maladies auto-immunes mais sont également très importantes dans la réponse immunitaire anti-bactérienne et anti-fongique [487].

Des études ont montré que les cytokines IL-6 et TGF- β sont importantes pour la différenciation des TCD4⁺ en Th17 [488]. Cependant, la présence seule de la cytokine TGF- β favorise plutôt la différenciation des TDC4⁺ en lymphocytes T régulateurs nécessaires au maintien de l'homéostasie [464, 474].

c) Cellules T régulatrices

Enfin, en fonction des signaux reçus dans le thymus, les lymphocytes TCD4⁺ peuvent se différencier en lymphocytes T régulateurs (Treg). En effet, des études ont montré que le développement thymique des Treg était dépendant de la présence des cytokines IL-2 et TGF- β ainsi que de la présence de la molécule de costimulation CD28 [489]. Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'un traitement des lymphocytes périphérique naïfs TCD4⁺ avec les cytokines TGF- β ou IL-10 et IL-2 est associé à une stimulation de leur TCR pouvant conduire à l'émergence de lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) [474, 490]. Ainsi, *in vivo*, la population de lymphocytes T régulateurs est constituée à la fois de lymphocytes T régulateurs naturels (Treg) et de lymphocytes T régulateurs induits (iTreg). Ces cellules sont impliquées dans la tolérance du soi, dans les tolérances centrale et périphérique mais surtout dans la modulation et la régulation des réponses immunitaires [491, 492].

La figure 29 décrit les quatre principaux lignages des lymphocytes T CD4+.

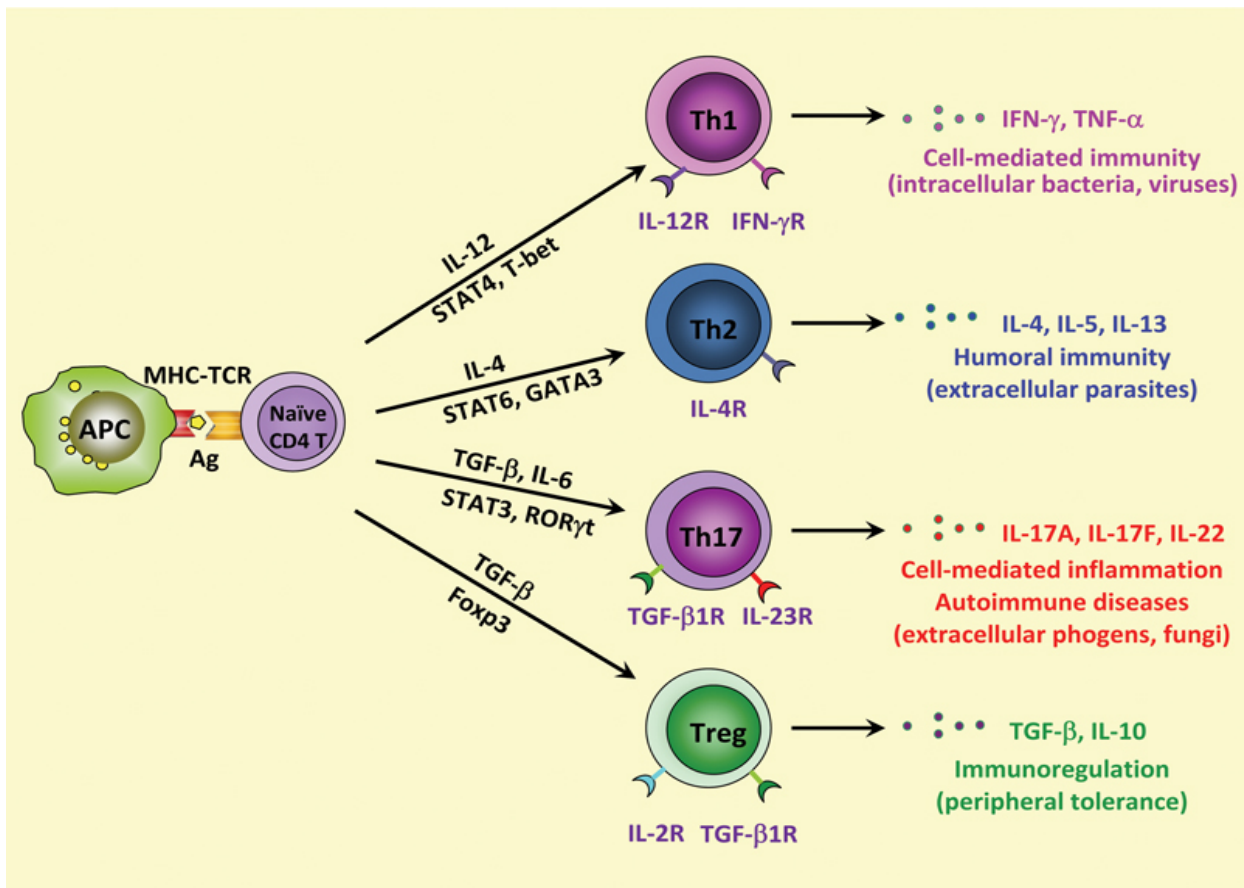


Figure 29 : Les quatre principaux lignages des cellules CD4+ : Th1, Th2, Th17 et Treg. Après stimulation antigénique, les lymphocytes T helper naïfs peuvent se différencier en quatre lignages principaux que sont les Th1, Th2, Th17 et Treg. Ces lignages sont caractérisés par l'expression de facteurs de transcription et la sécrétion d'une signature cytokinique. Par exemple, les Th1 expriment les facteurs de transcription TBET et STAT4 et sécrètent de l'IFN- γ et TNF α tandis que les Treg expriment le facteur de transcription FOXP3 et sécrètent les cytokines IL-10 et TGF- β . D'après Leung, *s et al, cellular and molecular immunology, 2010*.

D'autres lignages de LTCD4+ ont également été décrits : ce sont les lymphocytes **Th3, Th9, Th22, Tfh et Tr1** [466, 493, 494]. En effet, les Th3 sécrètent principalement du TGF- β [495], les Tr1 principalement de l'IL-10 [90], les Th9 principalement de l'IL-9 [496], les Th22 principalement de l'IL-22 [497] et les Tfh qui sécrètent principalement de l'IL-4 et l'IL-21 et se localisent dans les régions folliculaires de la rate et des ganglions où ils contribuent à la formation de centres germinatifs [498].

La différenciation des cellules TCD4⁺ est contrôlée par l'engagement du TCR, par l'environnement cytokinique et l'expression de certains facteurs de transcription [464]. En effet, la présence de certaines cytokines spécifiques va favoriser la différenciation de chaque lignage Th :IL-12/IFN- γ pour les Th1; IL-4/(IL-2, IL-7, TSLP) pour les Th2; TGF- β /(IL-6, IL-21, IL-23) pour les Th17 et TGF- β /IL-2 pour les Treg [464]. Les facteurs de transcription qui dirigent cette différenciation sont les suivants : TBET/Stat4 pour les Th1, GATA3/ Stat5 pour les Th2, ROR γ t/Stat3 pour les Th17 et FOXP3/Stat5 pour les Treg (voir figure 29) [464]. Certaines cytokines et certains facteurs de transcription sont donc communs entre différents lignage T, ce qui suggère la possibilité qu'un lignage puisse développer les caractéristiques d'un autre. En effet, les cellules Th sont dotées d'une très grande plasticité. Ainsi, en fonction de l'environnement cytokinique, de l'étape de différenciation et/ou en fonction de la stimulation antigénique, on peut observer des transitions Th1/Th2, Th2/Tfh, Th1/Th17, Th1/Treg et Th17/Treg [464, 486, 499, 500]. La figure 30 est une représentation schématique de la plasticité des cellules T helper.

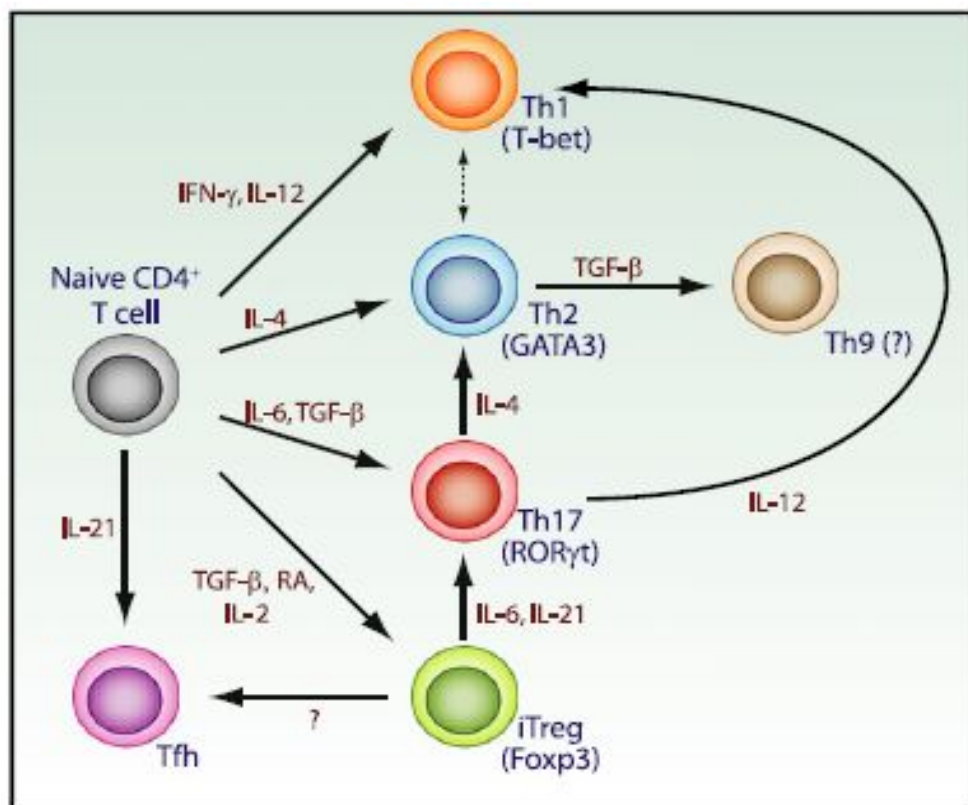


Figure 30 : Plasticité des cellules T helper. La plasticité des lymphocytes T helper dépend de l'environnement cytokinique, du stade de différenciation et de l'expression des facteurs de transcription. Ainsi, on peut observer une certaine plasticité entre les lignages Th1/Th2, Th2/Th9, Th1/Th17, Th2/Th17 et Th17/ iTreg. D'après Zhou, L et al, *Immunity* 2009.

B/ LA REPONSE IMMUNE DANS L'HEPATITE C

1- Généralités

Le foie est la glande la plus volumineuse de l'organisme qui assure plusieurs fonctions importantes notamment l'épuration de l'organisme. De part sa localisation et ses fonctions essentielles, il est continuellement exposé à des agents pathogènes, des toxines et virus divers. En effet, le foie, qui reçoit la circulation sanguine systémique *via* l'artère hépatique et celle en provenance de l'intestin *via* la veine porte, est en contact permanent avec les pathogènes. Par ailleurs, c'est un organe richement vascularisé conduisant au développement d'un microenvironnement immunitaire hépatique particulièrement riche en cellules du système immunitaire inné (macrophages et cellules dendritiques) [501, 502]. D'autres cellules non hématopoïétiques peuvent aussi jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules de Kupffer qui sont des macrophages spécifiques du foie, les cellules endothéliales bordant les sinusoides hépatiques, les cellules étoilées de l'espace de Disse et les hépatocytes [501] (Figure 31). Le foie est également riche en cytokines immunosuppressives, parmi lesquelles l'IL-10 et certains sous-types cellulaires expriment le ligand inhibiteur PD-L1 (programmed death-ligand 1) [88]. En conséquence, les antigènes sont présentés aux lymphocytes dans un contexte cytokinique immunosuppresseur, ce qui induit un état de tolérance immunitaire que certains pathogènes comme le VHC peuvent exploiter pour établir leur persistance.

Après infection par le virus de l'hépatite C, environ 15-20% des patients développent une guérison spontanée [8, 35]. Chez ces patients, les réponses immunes ont été capables de contrôler l'infection et de permettre l'élimination du virus. En effet, parmi ces cellules immunitaires, les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK ont la capacité de détruire les cellules infectées pour éradiquer le virus [503]. Des études ont clairement montré que cette élimination virale, pendant la phase aiguë de l'infection, reposait sur une réponse immunitaire Th1 vigoureuse et soutenue (voir figure 31) [504]. Cependant, cette guérison ne confère pas d'immunité protectrice [505]. Le passage de l'infection à la chronicité survient dans environ 80% des cas et serait dû à l'échec des réponses immunes à contrôler la réplication du virus et sa propagation [504]. Le contrôle de l'infection virale résulte donc d'un équilibre entre les mécanismes immunitaires de l'hôte et les stratégies d'évasion virale face au système immunitaire. En effet, la guérison spontanée résulte principalement (i) d'une induction rapide de la réponse immune innée à travers l'induction de l'expression des gènes de l'interféron (IFN) suivie (ii) de l'induction de la réponse immune adaptative [506].

La figure 31 représente la réponse immunitaire innée du foie après infection par le virus de l'hépatite C et le rôle central de l'IFN.

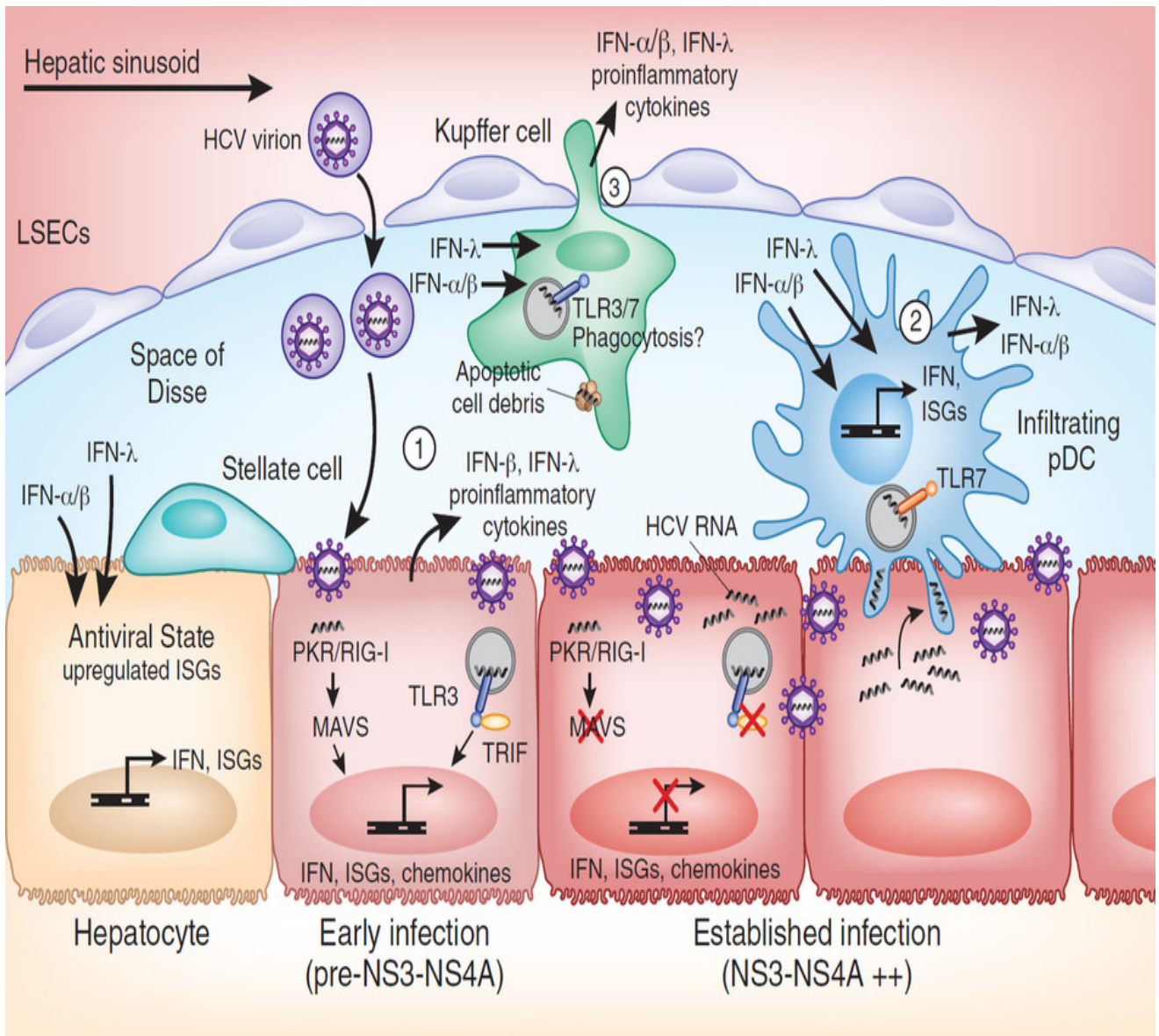


Figure 31 : Infection par le VHC, réponse immunitaire innée dans le foie et rôle central de l'IFN. Le foie est constitué de différents types cellulaires qui ont la capacité de sécréter l'IFN lorsqu'ils sont stimulés ou infectés par le VHC. Ces cellules incluent les hépatocytes (1), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (2) et les cellules de Kupffer ou macrophages du foie (3). Ces cellules sécrètent des quantités importantes de cytokine anti-virales IFN- γ , IFN- α et IFN β , conduisant à la transcription de nombreux ISGs. L'IFN favorise ainsi un état antiviral limitant la dispersion du virus. L'activation de ces cellules conduit au développement de la réponse adaptative VHC spécifique responsable de l'élimination du virus. Néanmoins, grâce à ses protéines virales NS3/4a qui clivent TRIF et CARDIF, le VHC peut échapper à la réponse immunitaire médiée par l'IFN. D'après Horne, S. et Gale, M. *Nature medicine* 2013

2- L'immunité innée et le l'hépatite C

La réponse immune innée est la première barrière non spécifique contre le virus de l'hépatite C. Elle intervient au cours des premières heures de l'infection et conduit à la production de quantités importantes d'interférons (IFNs) [506]. En effet, peu de temps après l'infection, le système immunitaire va activer la réponse immune innée en réponse à la présence d'antigènes viraux. Ainsi, les motifs viraux PAMPs (pathogen associated molecular pattern) seront reconnus par les PRRs (Pattern recognition receptors) dont les principaux sont les récepteurs TLR-s (toll like receptor), RIG-I-like et NOD-like présents sur les cellules de l'immunité innée comme les macrophages et les cellules dendritiques [507]. Les principaux PRRs impliqués dans la détection des acides nucléiques viraux et notamment du VHC sont : les TLR-s intracellulaires (TLR-, 3, 7, 8 et 9) et RIG-I, à l'origine de la production d'IFN de type I [508, 509]. Par ailleurs, une activation de la réponse immune innée par les protéines Core, NS3 et NS5A du VHC, *via* l'activation des récepteurs TLR-1, TLR-2, TLR-4 et TLR-6 exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée, a été mise en évidence [510, 511]. L'engagement de ces récepteurs conduit à l'activation des facteurs de transcription NFkB et IRF3 qui vont favoriser la transcription des gènes codant pour différents types d'IFN [506]. L'activation de la réponse immune va donc aboutir à l'activation de cascades intracellulaires conduisant à la production d'IFN de type I (comprenant les IFN- α et un IFN- β), d'IFN de type II (IFN- γ) et d'IFN de type III (comprenant les IFN- λ 1, - λ 2, and - λ 3 aussi connu sous le nom d'IL-29, IL-28A, et IL-28B) [512, 513]. Des études ont montré que les IFN de type I ont la capacité d'augmenter la présentation antigénique et la prolifération des cellules T mémoires, de favoriser la maturation des cellules dendritiques, d'inhiber l'apoptose des cellules T et de favoriser l'activation des cellules NK [514]. Les IFNs sont donc les cytokines centrales de la réponse immune à l'infection par l'hépatite C (voir figure 31) [501].

Les différents types d'IFNs produits vont induire une réponse anti-virale périphérique et hépatique grâce à l'activation de la transcription d'une centaine de gènes qui sont spécifiques du type d'interféron et de la cellule cible [506, 515]. Ces gènes induit par les IFN sont appelés ISGs (interferon stimulating genes). Des études récentes ont montré que les molécules PAMP dérivés du VHC régulaient activement l'induction des ISG pendant la phase aiguë *via* l'activation des TLR-s et NLRs qui favorisent la production des IFNs [501, 516]. Ces cytokines sont principalement sécrétées par les cellules sentinelles de l'immunité innée que sont : les cellules dendritiques (DC), les cellules tueuse naturelles (NK), les lymphocytes NKT et les macrophages [504]. La figure 32 montre la chronologie de la réponse immune innée et adaptative suite à une l'infection par le virus de l'hépatite C.

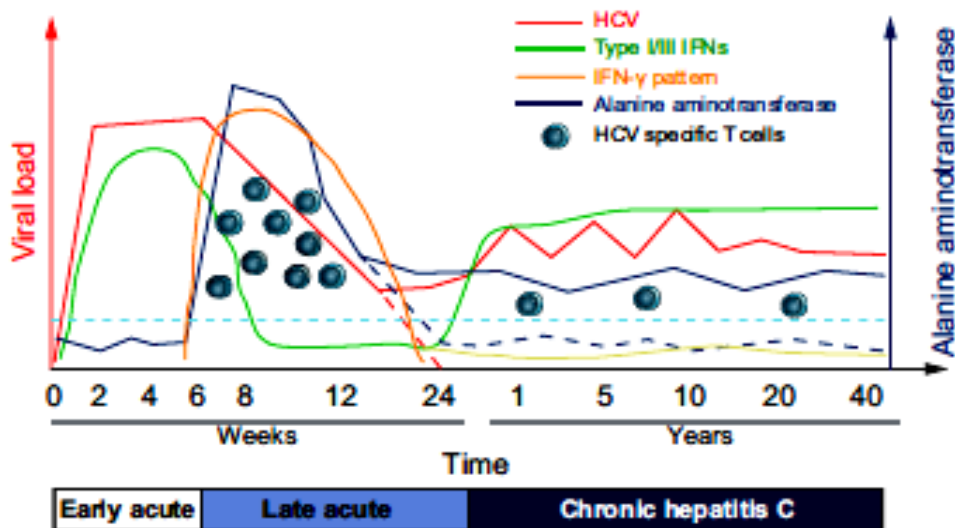


Figure 32 : Rôle de l’interféron et de l’immunité adaptative dans l’infection par le VHC. Peu de temps après infection, la charge virale augmente rapidement pour atteindre 10^5-10^7 IU/ml (ligne rouge). Au cours de la phase aiguë précoce (4-8 semaines), une réponse immunitaire innée dirigée par les IFNs de types I et III favorise la réduction de l’infection (ligne verte). Avec le recrutement de lymphocytes T VHC-spécifiques pendant la phase tardive de l’infection aiguë (6-24 semaines), le transcriptome du foie est modifié vers la production de gènes induit par l’IFN- γ (ligne jaune). En parallèle, on observe une élévation du taux d’ALAT (ligne bleue). En cas de guérison, la charge virale devient indétectable (ligne rouge en pointillé), les niveaux d’IFN redeviennent bas (ligne verte) et le taux d’ALAT redevient normal (ligne bleue en pointillé). Lorsque cette réponse immunitaire est inefficace, l’hépatite C devient chronique. Ainsi, on note une recrudescence de la charge virale (ligne rouge), le taux d’ALAT reste élevé (ligne bleue), la réponse immunitaire innée dirigée par les IFNs de types I et III persiste chez certains patients (ligne verte), la production hépatique des gènes induit par l’IFN- γ diminue (ligne jaune) et le recrutement de lymphocytes T VHC-spécifiques diminue. *D’après Heim, M., Journal of hepatology, 2014.*

2.1- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les acteurs majeurs de l’immunité car elles sont indispensables dans l’activation de la réponse adaptative. On distingue deux types de cellules dendritiques : les cellules dendritiques myéloïdes ou mDC (dérivés des monocytes) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDC (dérivés de la lignée lymphoïdes) [517]. Ces cellules dendritiques possèderaient des rôles opposés dans l’infection par le VHC [518]. En effet, diverses études ont montré que la stimulation des mDC conduisait au développement d’une infection chronique tandis que la présence des pDC dans le foie infecté, seraient associée à l’élimination du VHC [501, 519, 520]. De nombreuses études montrent que grâce à des interactions cellulaires avec les hépatocytes infectés, les cellules dendritiques plasmacytoïdes représentent les cellules majeures de production

des IFNs [501, 517, 521]. Cependant, au cours de l'infection par le VHC, la fréquence des pDC dans le sang et leur capacité à produire des IFNs de type I est réduite [522]. Une des explications pourrait être une action indirecte du VHC dont les protéines Core et NS3 activent les monocytes *via* TLR-2 pour produire du TNF α qui peut en retour inhiber la production d'IFN- α par les pDC en induisant leur apoptose [523]. Par ailleurs, le VHC est également capable d'altérer la fonction des mDC. En effet, les protéines virales Core, NS3, NS4 et NS5 sont capables d'affecter les fonctions des mDC immatures et matures, en inhibant l'expression des molécules de costimulation et des CMH, en diminuant la sécrétion d'IL-12 et en induisant l'expression de molécules cytosoliques [524]. Cette altération des mDC peut conduire à une activation insuffisante des lymphocytes T VHC-spécifiques et donc un retard dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative [525]. En effet, des études *in vitro* ont montré que la protéine NS3 du VHC pouvait altérer le sécrétome des mDC en réduisant la production d'IL-12 et en augmentant la production d'IL-10 [525]. Par ailleurs, des quantités importantes d'IL-10 ont également été retrouvées dans les séra de patients chroniquement infectés par le VHC [526]. Cette surproduction d'IL-10 par les mDC pourrait favoriser le recrutement de Treg. En effet, il a été démontré que les mDC des patients infectés par le VHC peuvent induire *in vitro* l'expansion de Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ [527].

D'autres études montrent que les lipoviroparticules du VHC peuvent se lier au TLR-4 et altérer la présentation antigénique des mDC [528]. L'hypothèse d'un dysfonctionnement dans la capacité des mDC à présenter l'Ag est beaucoup plus controversée car certaines études décrivent une stimulation déficiente des lymphocytes TCD4⁺ pendant la phase chronique de l'infection en comparaison aux patients non infectés [522, 529], tandis que d'autres études ne trouvent pas cette différence ni chez l'homme ni chez le chimpanzé [530, 531]. Enfin, un dysfonctionnement des mDC pourrait indirectement impacter l'activation des NK. En effet, les DC des patients chroniquement infectés par le VHC seraient incapables d'augmenter leur expression de MICA/B (Major histocompatibility complex class I-related chain A/B) en réponse à IFN- α ce qui réduirait l'activation des cellules NK [532].

2.2- Les macrophages

Tout comme les cellules dendritiques, les macrophages, n'ont pas besoin d'être infectés par le VHC pour produire des IFNs [501]. En effet, le processus de dégradation dans les endosomes libère l'ARN viral qui peut alors être directement reconnu par les récepteurs TLR-s des macrophages [501, 506]. En effet, des études ont montré que le VHC pouvait activer les macrophages *via* des interactions avec des TLR-s endosomaux [533]. De plus, les macrophages surveillent régulièrement l'environnement et sont capables de reconnaître des cellules en apoptose, elles mêmes

préalablement infectées ou des particules virales afin de les éliminer [506]. *A contrario*, d'autres études ont montré que les macrophages pouvaient servir de réservoir de réplication au virus de l'hépatite C (en particulier pour le géotype1) [534]. En effet, ces études montrent que l'activation des macrophages par le VHC diminue leur activité de phagocytose au profit d'une production continue de virions [534]. Par ailleurs, d'autres études décrivent qu'une augmentation de macrophages hépatiques est associée à la progression de la fibrose après infection par le VHC [535].

2.3- Les cellules NK

Les études montrent que le nombre de NK (CD56^{dim} CD16+) est significativement diminué dans le sang des patients infectés par le VHC et dans celui des patients cirrhotiques ou non cirrhotiques [536, 537]. Le rôle des NK dans la persistance virale est mal connu mais compte tenu de leur implication dans la phase aiguë de l'infection, il est naturel de penser que toute altération de leur fonction ou diminution de leur activité cytotoxique puisse favoriser le passage à la chronicité [538]. En effet, des études ont montré que l'interaction directe entre la glycoprotéine d'enveloppe E2 et la molécule CD81 exprimée par les cellules NK pouvait altérer le fonctionnement de ces cellules tueuses [539]. Par ailleurs, il a également été démontré que l'infection chronique par le VHC pouvait altérer le sécrétome des cellules NK et notamment leur sécrétion d'IFN- γ [540]. De plus, certaines études ont montré que la cytokine IFN- γ produite par les NK possédait des propriétés anti-fibrosantes car inhibait le développement de la fibrose hépatique [541]. En outre, d'autres études suggèrent que les interactions avec le virus, *via* les récepteurs inhibiteurs ou activateurs des cellules NK seraient déterminantes pour l'immunité anti-virale et seraient impliquées dans l'éradication du VHC. En effet, la protéine virale Core favoriserait la stabilisation de l'expression des molécules du CMH de classe I et de HLA-E, entraînant ainsi une augmentation de l'expression de CD94/NKG2A sur les NK [532]. Cette augmentation de CD94/NKG2A inhibe les fonctions des cellules NK chez les patients infectés par le VHC [542]. Ce phénomène conduit les NK à sécréter des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β pour inhiber la réponse immune et favoriser le recrutement des Treg [532, 543]. Par ailleurs, *via* une interaction avec le TLR-4 des monocytes, la protéine NS5A du VHC peut inhiber l'expression du récepteur NKG2D sur les cellules NK, inhibant ainsi leur fonction *in vitro* [544]. Or, les NK sécrètent aussi de l'IFN de type II afin de favoriser l'élimination du pathogène [506]. Une production insuffisante d'IFN par les cellules NK peut conduire à l'altération du développement des cellules Th1 en faveur d'une réponse Th2, permettant ainsi la persistance virale et la chronicité de la pathologie [539]. De plus, une diminution du taux sérique d'IL-15 a été rapportée chez les patients VHC+ [532]. Cette diminution est

susceptible d'altérer la maturation et la survie des cellules NK [536]. Enfin, l'inhibition des cellules NK peut indirectement altérer la coopération avec les DC, diminuer la présentation antigénique, altérer la réponse Th1 et la prolifération des TCD8+ [538]. Ainsi, les cellules de la réponse immune innée sont essentielles dans l'évolution de la maladie car elles contribuent à l'éradication du virus pendant la phase aiguë de l'infection virale C. Par ailleurs, leur défaillance pendant l'infection aiguë retarde l'apparition de l'immunité adaptative et favorise l'évolution de l'hépatite C vers la chronicité [504].

Cependant, bien que les cellules de l'immunité innée peuvent contrôler la réplication virale, elles ne peuvent, à elles seules, conduire à l'élimination du virus [506]. Ainsi, l'efficacité de la réponse immune nécessite le recrutement de lymphocytes spécifiques du VHC et l'activation d'une réponse immune humorale et cellulaire (voir figure 32).

3- L'immunité adaptative dans l'hépatite C

L'immunité adaptative est un mécanisme de défense qui survient plus tardivement. Dans l'hépatite C, cette réponse adaptative survient avec le développement des lymphocytes VHC-spécifiques :entre la 6^{ème} et la 24 semaines post infection [506]. Cette réponse adaptative est caractérisée par quatre propriétés fondamentales: la spécificité antigénique, la diversité des antigènes reconnus, la mémoire immunitaire et la discrimination du soi et du non-soi. L'architecture hépatique favorise le contact entre les lymphocytes circulant et les hépatocytes [545]. Le foie est un organe d'environ 1.5Kg qui possède en moyenne 10^9 lymphocytes résidents soit environ 1 à 4% du pool total de lymphocytes dans l'organisme [419, 546]. Ces lymphocytes sont disposés préférentiellement dans les espaces portes mais dispersés également dans le parenchyme. La majorité des lymphocytes T du foie expriment le TCR $\alpha\beta$ exprimant la molécule CD3. Néanmoins, environ 15% expriment le TCR $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) [411]. Près de la moitié des lymphocytes T $\alpha\beta$ (45%) sont donc des lymphocytes T conventionnels (TCD4+ et TCD8+) tandis que l'autre moitié (55%) est constituée des cellules exprimant faiblement le CD3 tels que les lymphocytes T $\gamma\delta$, les lymphocytes B producteurs d'anticorps et les lymphocytes NK (NKT) qui produisent des quantités importantes de cytokines lorsqu'elles sont activées [547]. Parmi les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels du foie, environ 72% sont des lymphocytes cytotoxiques CD8+ (versus 38% dans le sang) [548]. Ainsi, la réponse immune adaptative est médiée par les lymphocytes B et T conduisant respectivement au développement de réponse immune humorale et cellulaire [411].

3.1- Réponse immune à médiation humorale

L'infection par le VHC conduit à la production de grandes quantités d'anticorps, dirigés contre des épitopes des protéines structurales et non structurales du virus [549]. Chez les patients, cette production d'anticorps anti-VHC est généralement détectée durant la phase aiguë [4]. En effet, ce sont les anticorps antiNS3, anti-Core et antiNS5 qui apparaissent le plus précocement, entre 3 et 12 semaines après infection. Ensuite, les anticorps antiNS4 apparaissent entre la 11^e et la 22^e semaine [550]. Contrairement à d'autres virus, il n'existe pas de profil sérologique caractéristique d'une étape donnée de l'infection et qui permettrait de prédire l'évolution de la maladie. La production de ces anticorps neutralisants est indispensable à l'élimination des particules virales libres et à l'inhibition de leur pénétration dans les cellules permissives. En effet, de nombreuses études effectuées chez les chimpanzés et chez l'homme ont montré la présence d'anticorps anti-VHC dans le sérum [7]. D'ailleurs, l'isolement de l'agent pathogène du VHC a été rendu possible grâce à la présence d'anticorps spécifiques dans les séra infectés [7]. La capacité de neutralisation de ces anticorps a été mise en évidence par des études *in vitro* montrant une inhibition de la fixation des gp d'enveloppe aux récepteurs cellulaires [551]. Par ailleurs, après l'internalisation du virus, les anticorps favorisent l'inhibition de la transmission virale [552]. Une des cibles principales des anticorps neutralisants semble être la région hypervariable 1 (HVR1) de la glycoprotéine virale E2. En effet, l'utilisation de séra hyper-immuns obtenus après immunisation de lapins avec un peptide HVR1 synthétique, montre que les anticorps sériques peuvent protéger des cultures cellulaires ou des chimpanzés de l'infection par la souche de VHC correspondante [553, 554]. D'autres études ont montré que ces anticorps antiHVR1 pouvaient inhiber l'attachement viral, réduire l'infection et précipiter le VHC [555]. Des études montrent également que les séra de patients chroniquement infecté par le VHC contiennent des anticorps capables d'inhiber la fixation des protéines d'enveloppe virales aux récepteurs cellulaires des lignées d'hépatome humain [551]. En outre, la réponse humorale peut également éliminer les virus intracellulaires de manière anticorps dépendante (ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity) [556]. A l'opposé, ces anticorps anti-VHC seraient impliqués dans les manifestations extra-hépatiques de l'hépatite chronique C telles que la cryoglobulinémie mixte, la glomérulonéphrite ou la vascularite cutanée [557].

Bien que la réponse humorale spécifique du VHC puisse neutraliser le VHC, elle n'est pas suffisante pour protéger l'hôte d'une réinfection éventuelle et elle ne permet pas, à elle seule, d'éviter la dissémination du virus au cours de l'infection aiguë d'où l'importance du développement d'une réponse immune cellulaire [556].

3.2- Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Les hépatocytes infectés expriment des antigènes appartenant à toutes les protéines virales susceptibles d'être découpées et présentées par des molécules du système CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). L'expression des molécules CMH de classe I, très faible dans le foie humain normal, est nettement augmentée lors des hépatites C chroniques et il a été montré récemment que les hépatocytes infectés co-expriment des molécules d'adhésion nécessaires à l'interaction virus/cellules T CD8+ spécifiques [558]. Par ailleurs, la fréquence des molécules CMH de classe II qui présentent les antigènes du VHC aux lymphocytes TCD4+ spécifiques serait tout aussi importante [559]. Les conditions sont donc réunies pour que les hépatocytes infectés par le VHC soient reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques et auxiliaires. De plus, des études ont montré que 4 à 8 semaines après infections par le VHC, les lymphocytes T spécifiques étaient recrutés dans le foie afin d'éliminer le virus *via* des mécanismes cytokines-dépendants ou cytotoxiques [506].

a- Les lymphocytes NKT

Les cellules natural killer (NK et NKT) représentent 40% des lymphocytes totaux dans le foie sain, mais cette proportion passe à 90% chez les patients ayant une tumeur hépatique [560]. Ces cellules NKT (natural killer T) ont été décrites en 1987 comme des cellules lymphocytaires associées à la réponse immunitaire innée [561]. Ils sont responsables de la sécrétion d'importantes quantités d'IFN de type II et favorisent l'éradication du pathogène [506]. Par ailleurs, ils jouent donc un rôle important dans l'infection par le VHC. Des études ont montré une augmentation du pourcentage des lymphocytes NKT (CD3+CD56+) dans le foie des patients chroniquement infectés par le VHC ou cirrhotiques [562, 563]. Cette augmentation de NKT conduit à une production importante d'IL-4, IL-13 et ostéopontin qui sont associés à une progression de la fibrogenèse hépatique [541]. Néanmoins, les cellules NKT peuvent en même temps atténuer la fibrose du foie en sécrétant de l'IFN- γ [541]. Cependant, le pourcentage de NKT reste significativement plus élevé dans le sang de patients même si aucune corrélation avec les paramètres biochimiques ou histologiques n'a pu être décrite [564, 565]. En outre, La présence des cellules « NKT CD1d-réactifs Th1-like » productrices de l'IFN- γ a été décrite au niveau du foie de patients chroniquement infectés par le VHC et pas dans le sang [565, 566].

b- Les lymphocytes T γ δ

Le rôle des Lymphocytes gamma delta (T γ δ) dans l'hépatite chronique virale C est controversé. Ces lymphocytes représentent 15% des lymphocytes résidents du foie [567]. Certaines études décrivent une augmentation de ces cellules dans le sang et dans le foie des patients chroniquement infectés par le VHC par rapport à des patients non infectés [568, 569]. D'autres études montrent que la liaison de la gp E2 avec le récepteur CD81 peut favoriser l'activation des LT γ δ [569]. Par ailleurs, d'autres études ont également décrit une augmentation des LT γ δ corrélée à une augmentation de l'activité nécrotico-inflammatoire dans le foie [570]. Cependant, des travaux publiés en 2002 ont décrit une diminution des LT γ δ dans le sang des patients VHC+ [571]. Certaines études menées sur des modèles murins montrent que les LT γ δ possèderaient un rôle protecteur contre les lésions tissulaires au cours des pathologies inflammatoires chroniques [572].

c- Les lymphocytes TCD8+

Dès la découverte du VHC, la présence des cellules T CD8+ cytotoxiques (CTL) dérivant de foies de patients chroniquement infectés a été mise en évidence [573, 574]. Ces CTL reconnaissent des antigènes peptidiques présentés à la surface des molécules de CMH de classe I conduisant à l'activation de la réponse cytotoxique aboutissant à la sécrétion de facteurs cytotoxiques tels que les granzymes et perforines [575, 576]. De nombreuses études ont décrit une réponse lymphocytaire cytotoxique spécifique du VHC dans le sang périphérique et dans les biopsies hépatiques de patients atteints d'hépatite C [577, 578]. En effet, les CTL spécifiques du VHC sont abondamment recrutés dans le foie où ils constituent la plus grande population de cellules T infiltrant les tumeurs [579]. Même si des études ont également détecté la présence de CTL spécifiques du VHC dans la circulation périphérique [580], cette dernière reste très rare et ceci peut s'expliquer par le recrutement spécifique et massif des CTL au niveau du foie, site de la réplication virale et de l'inflammation [506, 581]. De nombreuses études ont montré que les CTL spécifiques du foie peuvent reconnaître les épitopes antigéniques des protéines virales Core, NS2, NS3, NS4 et NS5B, suggérant le caractère multi-spécifique de la réponse cytotoxique médiée par les CTL [582-584]. Ainsi, des réponses lymphocytaires cytotoxiques CD8⁺ restreintes à l'haplotype A2 du CMH ont été décrites contre des épitopes localisés dans la capsid et les protéines NS3, NS4 et NS5 à la fois chez des porteurs asymptomatiques et chez les patients chroniquement infectés [582]. Par ailleurs, une réponse CTL restreinte à l'haplotype B4 du CMH et dirigée contre un épitope de la capsid a également été décrit chez ces patients chroniques [575].

Les épitopes immuno-dominants semblent donc principalement localisés sur les protéines virales non structurales, sur les protéines de la capsid et sur les glycoprotéines d'enveloppe [579]. Cette diversité d'épitope de la réponse cytotoxique spécifique du VHC semble plus large chez les patients infectés ayant développé une guérison spontanée pendant la phase aiguë que chez ceux développant une hépatite chronique [585, 586]. L'action des CTL sur la clairance virale pourrait résulter de la lyse des cellules infectées par apoptose et/ou par l'action de certaines cytokines capable d'inhiber la réplication virales telles que TNF α et IFN- γ [587]. En effet, des études récentes ont clairement démontré qu'au cours de l'hépatite aiguë, l'augmentation périphérique de la fréquence des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC et produisant de l'IFN- γ était corrélée à une faible progression de la maladie et à l'éradication du VHC [588, 589]. Par ailleurs, l'altération de la capacité des cellules dendritiques à activer les lymphocytes T CD4+ est profondément altérée chez les patients chroniquement infectés [590]. Or, cette altération fonctionnelle entraîne une diminution de la production d'IL-12, ce qui favoriserait une activation des cellules Th2 au détriment des Th1 sécréteurs d'IFN- γ [591]. Or, la réduction de sécrétion d'IFN- γ conduit à une mauvaise activation des TCD8+ [465]. Ainsi, la persistance virale, malgré la présence d'une forte réponse lymphocytaire T cytotoxique CD8 + spécifique, peut s'expliquer par un déficit fonctionnel de cette réponse en lien avec une limitation de la reconnaissance antigénique du virus par les lymphocytes T auxiliaires CD4 + [591].

d- Les Lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes TCD4+ ou T helper occupent une place centrale dans la réponse immune à l'infection par le virus de l'hépatite C et la diminution du titre viral coïncide avec l'apparition de cellules T spécifiques du VHC et avec la sécrétion d'IFN- γ dans le foie. En effet, après stimulation antigénique, ces lymphocytes produisent des quantités importantes de cytokines aidant la production des anticorps par les lymphocytes B, favorisant la phagocytose par les macrophages, favorisant l'activité des leucocytes et favorisant l'activité cytotoxique des CTL [464, 465]. Une réponse cellulaire TCD4 positive spécifique au VHC a été décrite dans la circulation périphérique et dans les biopsies hépatiques des patients VHC+ [592, 593]. Il n'existe pas encore de consensus qui définisse les épitopes immuno-dominants au sein de la polyprotéine virale mais les protéines de la capsid, les glycoprotéines d'enveloppe et les protéines NS3 et NS4 seraient les plus fréquemment reconnues par les TCD4+ [594, 595]. Il existe une corrélation positive entre la réponse lymphocytaire TCD4+ spécifique et la clairance virale au cours la phase aiguë de l'infection [596, 597]. En effet, des études ont également montré une augmentation des cellules T effectrices CD4+CD25+CD127^{high}FOXP3- au cours du traitement antiviral [598]. Cependant, la réponse CD4

n'est pas homogènes chez tous les patients [599]. Cette diversité de réactivité des lymphocytes T CD4+ vis-à-vis des protéines virales semble déterminer par la capacité des malades à éliminer le virus ou à évoluer vers la chronicité [597, 600]. Par ailleurs, des études menées chez le chimpanzé ont montré que le seuil d'une réponse CD4+ reconnaissant au moins 5 régions différentes de la polyprotéine virale était indispensable à l'élimination virale complète [601].

En outre, des études de prolifération des lymphocytes T CD4+ circulants et l'analyse de la production périphérique de cytokines en réponse à différents épitopes du VHC ont montré des résultats révélateurs sur le rôle des lignages CD4 dans l'infection par le VHC. En effet, on note une sécrétion importante de cytokines anti-virales et inflammatoires Th1 (IL-1 α , IFN- γ , IL-2 et TNF α) chez les patients qui ne développent pas d'hépatite chronique tandis qu'on a une sécrétion importante de cytokines Th2 anti-inflammatoires (IL-4, IL-5 et IL-10) chez les patients ayant une évolution chronique [602-604]. La clairance virale est donc plus probable lorsque la réponse CD4+ est de type Th1 (IFN- γ et IL-2) [504, 605]. En effet, en plus de leur propriétés anti-virales, ces cytokines pro-inflammatoires sont capables d'activer la cytolysse virale à la fois par les cellules CTL et par les cellules NK [506].

Au stade chronique de l'infection, la réponse TCD4+ est très importante mais n'empêche pas la persistance du virus et favorise plutôt l'évolution des lésions hépatiques [606]. En effet, des études ont suggéré que l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe virale E2 avec le récepteur CD81 des lymphocytes T favorisait le développement d'une réponse cellulaire Th2, aux dépens de la réponse Th1 [607]. Ceci peut expliquer l'inflammation hépatique et la persistance virale observée chez les patients chroniquement infectés par le VHC. En outre, d'autres études ont montré que les protéines virales Core, NS3, NS4 et NS5 pouvaient inhiber la fonction des lymphocytes T en altérant les cellules dendritiques (DC) matures et immatures, conduisant au développement d'une réponse immunitaire affaiblie [608]. De plus, chez les patients transplantés pour cause virale C, une prolifération modérée des TCD4+ semble associée à une récurrence histologique minime tandis qu'une absence de TCD4+ est associée à une récurrence sévère [609]. En conséquence, la persistance virale peut s'expliquer, au moins en partie, par une réponse lymphocytaire T CD4+ spécifique partiellement insuffisante, notamment en termes de diversité des épitopes antigéniques reconnus sur la polyprotéine du VHC et associée à une sécrétion réduite de cytokines de type Th1. Mais cette persistance pourrait aussi être due soit aux protéines virales qui vont détourner la réponse immune ou soit au recrutement important de lymphocytes T régulateurs qui vont inhiber la réponse immune (voir figure 33) [610, 611]. La figure 33 présente la réponse adaptative après infection par le virus de l'hépatite C

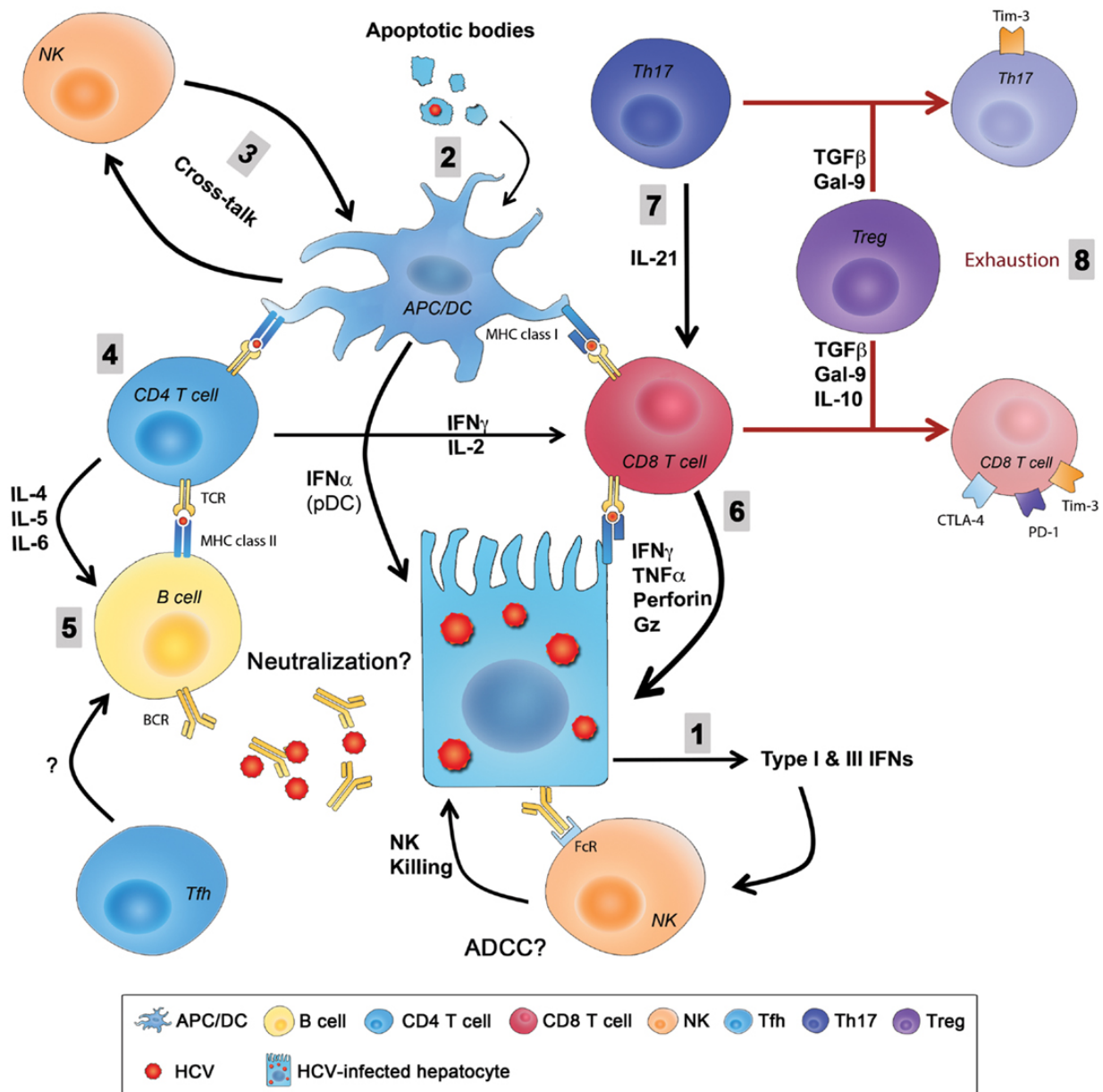


Figure 33 : Infection par le VHC et réponse immunitaire adaptative. L'infection des hépatocytes et des cellules dendritiques plasmacytoïdes conduit à la production d'IFN de types I et III qui créent un environnement antiviral (1). Les macrophages résidents du foie vont dégrader les cellules infectées *via* des mécanismes apoptose-dépendants et vont présenter les antigènes viraux aux cellules de l'immunité adaptative CD4+ et CD8+ (2). La communication entre les NK et les DC va favoriser la présentation antigénique (3). L'engagement du TCR des cellules CD4+ va conduire à la sécrétion importantes de diverses cytokines (4) qui vont favoriser la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps (5) et l'activation de la fonction cytotoxique des lymphocytes TCD8+ (6). Ces dernières vont éliminer les cellules infectées en sécrétant des cytokines anti-virales (IFN-γ) et en sécrétant des molécules cytotoxiques granzymes et perforines (6). La présence de cellules pro-inflammatoires Th17 amplifie la réponse des CTL, mais cette réponse peut être inhibée par la présence des lymphocytes T régulateurs (8). *D'après Abdel-Hakeem, M et Shoukry, N, front. Immunol. 2014.*

4- Réponse immunitaire et échappement du virus

Chez environ 80% des patients, malgré le développement des réponses immunes innées et adaptatives, l'hépatite C aiguë devient chronique [32]. Néanmoins, cette chronicité est caractérisée par des réponses immunes cellulaires et humorales se développant à la fois au niveau intra-hépatique et en périphérie [411]. Ainsi, pour échapper à cette réponse immune, le virus de l'hépatite C va développer de nombreuses stratégies. En effet, certaines protéines virales (NS3/4A) peuvent cliver et inactiver deux molécules importantes pour l'induction de l'IFN (TRIF et CARDIF) [184]. Par ailleurs, la production d'ISG reste très importante pendant la chronicité mais peut contribuer à l'aggravation des lésions hépatiques [606]. Ainsi, la présence de l'IFN pendant la chronicité peut également être d'un mauvais pronostic. En effet, des études ont montré que les patients chroniquement infectés par le VHC et qui possèdent une expression constitutive d'ISG ne répondent pas bien au traitement IFN-PEG+RBV [117, 506]. Les mécanismes qui protègent le VHC de la réponse immune innée médiée par l'interféron ne sont pas encore bien connus mais ils pourraient impliquer une localisation de la réplication virale dans des compartiments cellulaires non accessibles à la molécule anti-virale IFN [506]. L'échappement du virus à la réponse immune adaptative résulte quant à elle de l'induction de mutations du génome viral qui réduisent la reconnaissance spécifique par les anticorps et les TCD4+. Cet échappement conduit au développement de la chronicité, caractérisée par la présence de cellules immunitaires (B, T et NK) incapables de tuer le virus et dont les activités favorisent la progression de la maladie hépatiques [506]. Les mécanismes de la persistance virale sont donc ceux de l'échec des réponses immunes à contrôler la réplication du virus et sa propagation. De nombreuses études attribuent la chronicité du VHC à des raisons multifactorielles telles que les caractéristiques virologiques ou les caractéristiques liées à l'hôte mais d'autres études, dont les nôtres, associent en partie cette aggravation à la présence des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui favorisent l'environnement immunosuppresseur et la progression de la maladie [610, 611].

C/ LES LYMPHOCYTES T REGULTEURS

1- Histoire de la découverte des cellules régulatrices

En 1969, une première étude a suggéré la présence de mécanismes d'induction de tolérance du soi [612]. En effet, ce travail a montré que la thymectomie néonatale réalisée trois jours après la naissance chez la souris donnait des anomalies ovariennes auto-immunes qui pouvaient être prévenues par la greffe d'un thymus d'une souris histocompatible. Au début des années 1970, une série de publications a montré une régulation négative exercée par certains lymphocytes T et se traduisant par une inhibition des fonctions effectrices des cellules Th [613]. Ces lymphocytes T spécifiques provenaient du thymus et avaient la capacité de supprimer les lymphocytes conventionnels T helper ainsi que sécréter des facteurs solubles important dans la régulation de la réponse immunitaire. Les Docteurs Gershon, R. et Kondo, K. furent les tout premiers à nommer cette population « lymphocytes T suppresseurs » [613]. Cette population a fait l'objet de nombreuses études, mais c'est en 1985 que des premières études ont apporté les preuves convaincantes de l'existence de ces cellules T suppressives, notamment dans le contexte des pathologies auto-immunes [614]. Par ailleurs, d'autres études réalisées en 1993 ont suffi à confirmer la présence d'une population de lymphocytes TCD4+, différente des lignages Th1 et Th2 et possédant la capacité d'inhiber le développement des maladies auto-immunes [615].

Au milieu des années 1990, des analyses phénotypiques et fonctionnelles ont permis de caractériser cette population et les lymphocytes T suppresseurs ont alors été renommés « lymphocytes T régulateurs » ou Treg par le Dr. Sakaguchi, S. et ses collaborateurs [616]. En effet, ils ont préparé des suspensions cellulaires de lymphocytes TCD4+ déplétées en CD25, et ils les ont injecté dans des souris BALB/c Nu/+. Ces dernières ont développées diverses pathologies auto-immunes (gastrite, thyroïdite, polyarthrite, etc.), mais des injections progressives de cellules CD4+CD25+ ont inhibé le développement de ces maladies auto-immunes et ce de manière dose dépendante. Ainsi, leurs travaux ont permis de mettre en évidence l'expression constitutive de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (IL2RA ou CD25) sur les lymphocytes T régulateurs qui représentent environ 10% des TCD4+ et environ 1% des TCD8+ périphériques [616, 617]. On sait que ces Treg s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs et sur les sites d'inflammations chroniques et que leur présence corrèle avec la progression de la pathologie [235]. Par ailleurs, une déplétion en cellules T CD4+CD25+ conduit au développement d'une réponse immune anti-tumorale et anti-virale plus efficace, prouvant de fait leur rôle dans le contrôle et la détérioration de la réponse immune [618].

Depuis leur découverte, de nombreuses équipes ont essayé d'isoler et de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement cette sous population lymphocytaire mais ces travaux rencontrent de nombreuses difficultés liées notamment à l'absence de marqueurs spécifiques et à la complexité du mécanisme d'action des lymphocytes T régulateurs.

2- Rôle des lymphocytes T régulateurs dans la tolérance immunitaire

La tolérance immunitaire se définit comme la capacité du système immunitaire à ne pas s'activer en présence de certains antigènes avec lesquels il a préalablement été en contact, tels que les antigènes du soi. On distingue la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

- **La tolérance centrale** se déroule lors de la différenciation des lymphocytes T et B et conduit à la délétion clonale des lymphocytes auto-réactifs pour les antigènes du soi. En effet, lors de la différenciation thymique, les cellules T subissent trois étapes de sélection au cours de laquelle 99% des thymocytes sont éliminés [435] (voir chapitre sélection des lymphocytes TCD3+).
- **La tolérance périphérique** repose quant à elle sur plusieurs mécanismes. Le premier mécanisme est l'induction d'anergie qui intervient lorsque les lymphocytes T reconnaissent le complexe peptide/CMH en l'absence de signaux de costimulation [619]. En outre, un autre mécanisme est l'ignorance ou la ségrégation antigénique en présence de certains auto-antigènes dans des sites privilégiés tels que la cavité interne de l'œil, le pancréas ou le cerveau [620]. Le troisième mécanisme peut être la déviation cytokinique. En effet, les cellules lymphocytaires auto-réactives peuvent dévier et exprimer des cytokines de type Th2 qui limitent l'inflammation [621]. Cette tolérance périphérique est principalement assurée par les lymphocytes T régulateurs qui suppriment les réponses immunes aux antigènes du soi et favorisent le maintien de l'homéostasie immunitaire [618].

3- Les différentes populations de cellules régulatrices

Toute cellule de l'immunité innée ou adaptative possédant une activité immunosuppressive peut être définie comme une cellule régulatrice. Les cellules régulatrices de notre organisme sont très diverses. Ainsi, on peut distinguer :

3.1- Les cellules dendritiques régulatrices

Elles sont caractérisées par une sécrétion importante des cytokines immunosuppressives IL-10 et PDL1 [622]. Le plus souvent immatures ou semi-matures, ces cellules dendritiques (myéloïdes ou plasmacytoïdes) favorisent le développement des lymphocytes T régulateurs [623]. Ces cellules dendritiques dites tolérogènes peuvent reconnaître efficacement les pathogènes et les phagocyter mais elles sont caractérisées par une faible expression membranaire des molécules de CMH et des molécules de costimulation, ce qui réduit fortement la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T effecteurs [624, 625]. De plus, les DC tolérogènes suppriment également la réponse immune *via* la production de l'enzyme IDO (indolamine 2,3-dioxygénase) responsable de la production de facteurs toxiques pour les cellules [626]. Enfin, elles ont la capacité de convertir des lymphocytes TCD4+FOXP3- en lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) grâce à la sécrétion de quantités importantes de TGF- β et d'IL-10, favorisant ainsi l'environnement immunosuppresseur et la progression des tumeurs [627].

3.2- Les lymphocytes B régulateurs ou Breg

Ils sont retrouvés majoritairement dans la circulation périphérique et dans la rate [628]. Découverts pour la première fois en 1974, les Breg sont d'importants sécréteurs de cytokines anti-inflammatoires IL-10, IL35 et TGF- β [629-631]. Par ce mécanisme, les Breg favorisent le recrutement et l'expansion des lymphocytes T régulateurs dans les tumeurs et inhibent l'activation des lymphocytes T effecteurs, participant ainsi à l'inhibition de la réponse immune anti-tumorale [630, 632]. Par ailleurs, ces cellules sont importantes dans la destruction des cellules auto-réactives et dans la tolérance des greffons [633].

3.3- Les macrophages régulateurs

Généralement appelée macrophages M2, les macrophages régulateurs sont caractérisés par une sécrétion minimale d'IL-12 et une sécrétion importante d'IL-10 et de facteurs angiogéniques [634, 635]. Ce profil cytokinique confère aux macrophages des propriétés régulatrices importantes dans l'inhibition des processus inflammatoires. En effet, ces macrophages régulateurs inhibent la production du TNF α , favorisent la conversion des cellules TCD4+ en iTreg et stimulent le développement du lignage anti-inflammatoire Th2 [635, 636].

3.4- Les lymphocytes T régulateurs

Ils sont constitués des lymphocytes TCD8+ régulateurs, des lymphocytes NKT régulateurs et des différents sous types de lymphocytes TCD4+ régulateurs [637].

3.4.1- Les lymphocytes T CD8+ régulateurs

Bien que les Treg CD8+ aient été identifiés avant les autres types de Treg, ils restent encore très peu étudiés [638]. En effet le manque de marqueurs cellulaires spécifiques les rend difficiles à isoler et à caractériser [637]. Par ailleurs, le fait qu'ils ne représentent qu'environ 1% des lymphocytes de la circulation périphérique et environ 1% des thymocytes matures explique la difficulté de leur étude [616]. Néanmoins, des études suggèrent qu'ils exprimeraient les marqueurs CD25, CD103, CTLA4 (cytotoxic T-lymphocytes-associated antigen 4), CD28, LAG3, CD27, CD38, CD122, GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) et HLADR même si la plupart de ces marqueurs sont également exprimés sur les TCD8+ activés [639]. Ces cellules Treg CD8+ contribueraient à l'inhibition de la réponse immune dans les cancers et à la tolérance des greffons notamment *via* des mécanismes contact-cellulaires dépendants [640, 641].

3.4.2- Les cellules NKT régulatrices

Généralement appelées iNKT (invariant natural killer), les cellules NKT régulatrices représentent une population unique de lymphocytes T régulateurs à l'interface entre la réponse immune innée et adaptative [642]. Ces cellules sont caractérisées par une reconnaissance exclusive des antigènes glycolipidiques présentés par la molécule CD1d présente sur les CPA [637]. Les iNKT possèdent un répertoire TCR restreint qui leur permet tout de même d'inhiber la prolifération et la sécrétion cytokinique des cellules TCD8+ et Th1 [643]. Ces cellules sont pour la plupart soit CD4+ soit CD4-CD8- et quelques fois CD8+ [644, 645]. Des études ont montré qu'après stimulation, les NKT pouvaient sécréter des quantités importantes de facteurs régulateurs tels que IL-10, IL-13, IL-21, perforines, granzymes B et FasL [646]. Par ailleurs, ces cellules favorisent le développement des cellules Th2 et régulent l'immunité tumorale [642].

3.4.3- Les lymphocytes TCD4+régulateurs

Un autre sous-type de T régulateurs est celui des lymphocytes TCD4+ régulateurs (Treg) qui ont été identifiés pour la première fois en situation de désordres immunologiques, tels que

certaines pathologies auto-immunes inflammatoires [616]. En effet, la mise en évidence de ces cellules immunosuppressive ainsi que les caractéristiques de cette population seront discuté dans le *chapitre E*. Brièvement, des études montrent que les cellules TCD4+ régulatrices sont très importantes dans le maintien de l'homéostasie immunitaire et la tolérance périphérique du soi [616]. De plus, la présence de ces cellules T régulatrices peut être induites *in vivo* par des antigènes bactériens, viraux ou parasitaires [89, 647]. Ainsi, l'activité immunosuppressive des Treg CD4+ peut favoriser la persistance du pathogène en supprimant la réponse Th1 protectrice, ce qui peut augmenter la progression de la pathologie [648]. Les analyses phénotypiques réalisées chez la souris ont montré que ces lymphocytes T CD4+ expriment spécifiquement les marqueurs CD25 et FOXP3 [492]. Par ailleurs, ces Treg sont caractérisés par une expression constitutive du CD25 et une expression concomitante d'un ensemble de marqueurs tels que CTLA4, le GITR, Hélios, FOXP3 (forkhead box protein 3) et LAG3 (lymphocyte antivating gene 3) [649]. Néanmoins, de nombreuses études montrent que l'expression de ces marqueurs n'est pas spécifique des Treg humains. En effet, ces travaux montrent que l'engagement du TCR de certains lymphocytes TCD4+ conduit à l'expression des marqueurs associés aux Treg comme le CD25 [492].

Les lymphocytes T régulateurs CD4+ participent à la tolérance immunitaire en régulant les lymphocytes T effecteurs par des mécanismes contact-cellulaires dépendants, par la production de facteurs cytotoxiques ou par la sécrétion de cytokines immunosuppressives [650]. Ces cellules ont donc un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. En fonction de leur origine et de leur site de différenciation, on distingue trois populations distinctes de lymphocytes T régulateurs : les lymphocytes T régulateurs dérivés du Thymus (tTreg : thymic-derived Treg), les lymphocytes T régulateurs périphériques (pTreg : peripherally-derived Treg) et les lymphocytes T régulateurs induits *in vitro* (iTreg : *in vitro*-induced Treg) [2]. Cependant, les données de la littérature permettent de regrouper ces populations en deux familles principales : Les Treg dérivés du thymus qui sont généralement appelés lymphocytes T régulateurs « naturels » (nTreg ou Treg) et les lymphocytes T régulateurs « induits » qui regroupent les Treg convertis en périphérie (pTreg) et les Treg générés *in vitro* (iTreg) (voir figure 34) [2, 651].

a- Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg)

Contrairement aux lymphocytes T régulateurs naturels qui sont directement sélectionnés grâce à la présentation d'un antigène endogène du soi, les lymphocytes T régulateurs induits sont généralement retrouvés au niveau des sites d'inflammations chroniques où ils sont responsables de la régulation de la tolérance périphérique [619, 652, 653]. Ces lymphocytes T régulateurs induits ou

iTreg résultent généralement de (i) l'activation d'une cellule T mature en l'absence d'une exposition à un antigène, (ii) de l'activation d'une cellule T mature en présence de certaines cytokines immunosuppressives ou (iii) de la conversion de cellules conventionnelles T CD4+CD25-naïves [654, 655]. En fonction des marqueurs membranaires exprimés et en fonction des cytokines majoritaires produites, on distingue 4 sous populations de lymphocytes T régulateurs induits: les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) producteurs d'IL-10 ; les lymphocytes T régulateurs Th3 producteurs de TGF- β ; les lymphocytes T régulateurs iTR35 producteurs d'IL35 et les autres iTreg FOXP3+ (voir figure 34) [656]. Les Tr1 et les Th3 sont spécifiques des antigènes de la tolérance orale, de la flore bactérienne, des antigènes dérivés de pathogènes ou des auto-antigènes modifiés [657]. Ces iTreg contrôlent également le développement de l'auto-immunité et aident à la tolérance fœto-maternelle et à la tolérance des greffons [658, 659].

- **Les cellules Tr1 :**

Les cellules régulatrices de type 1 (Tr1) sont induites en périphérie, principalement par une exposition chronique aux antigènes en présence de la cytokine IL-10 (voir figure 34) [660]. Les Treg IL10+ ont été découverts la première fois dans le sang périphérique des patients sévèrement immunodéprimés et ayant développés une tolérance suite à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques HLA non compatibles [661]. Ces lymphocytes Treg IL-10+ ont alors été caractérisés sur la base d'une production excessive de la cytokine immunosuppressive IL-10 détectée dès 4h après activation avec un pic de concentration survenant vers 12-24H post-activation [661]. Plus tard, Groux et ses collaborateurs ont montré que des lymphocytes TCD4+ humains et murins, en présence d'IL-10 recombinante, favorisait l'émergence de clones T CD4+ qui proliféraient peu, sécrétaient peu d'IL-2, pas d'IL-4 mais produisaient d'importantes quantités d'IL10 [662]. Ils ont également montré que ces cellules étaient capables de supprimer la prolifération des lymphocytes TCD4+ antigène-spécifiques c'est pourquoi ils les ont appelée Tr1 (lymphocytes T régulateurs induits de type1) [662]. D'autres études ont également montré l'émergence de cellules Tr1 à partir de lymphocytes TCD4+CD25- sous l'action des cellules dendritiques immatures et en présence d'IL-10 recombinante [663]. Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cette population seront décrites dans le *chapitre D*.

▪ **Les cellules Th3 :**

Les lymphocytes T helper de type 3 (Th3) sont des lymphocytes T CD4+ régulateurs, décrits pour la première fois lors d'expérience *in vitro* de stimulation antigénique chronique par voie orale [664, 665]. En effet, l'exposition chronique de lignées de cellules T à des antigènes oraux MBP (myelin basic protein) a permis de générer des cellules T spécifiques, différentes du lignage Th1 et capables d'inhiber le développement de l'encéphalite auto-immune grâce à une sécrétion importante de TGF- β 1 (voir figure 34) [664]. Ce sous-type de Treg est le premier à avoir été décrit *in vivo* et il se retrouve majoritairement dans les muqueuses du tractus gastro-intestinal [666]. Cette population reste la moins connue car elle n'exprime pas de marqueurs spécifiques. Néanmoins, des études récentes suggèrent que l'expression du facteur de transcription Egr-3 (Early growth response 3) et la présence de la cytokine IL-4 sont indispensables à l'activité suppressive des Th3 car ils contrôlent la production du TGF- β 1 [667, 668]. Les Th3 peuvent également être générées lorsque des cellules TCD4+CD25- sont cultivées en présence d'IL-10, TGF- β , ligand de Flt-3 (foetal liver kinase), anti-IL-12 et antiCD40L [495]. Par ailleurs, les cellules Th3 seraient caractérisées par une expression constitutivement du TGF- β 1, des taux variables de CD25, CTLA4 et FOXP3 et aucune expression de CD45RO et de LAG3 (voir tableau 9) [669-671]. En outre, des études ont montré que des souris déficientes en lymphocytes Th3 développaient spontanément des maladies auto-immunes [672]. Bien que les Th3 soient induits de manière antigène-spécifique, leur action immunosuppressive reste large car passant principalement par la sécrétion de TGF- β [613]. Les cellules Th3 inhibent l'activité des cellules Th1 et Th2 et favorisent la sécrétion d'anticorps ce qui permet de limiter les inflammations locales [664]. Par ailleurs, ces cellules favorisent la tolérance des greffons mais surtout sont essentielles à la tolérance orale [669].

▪ **Les cellules iTR35 :**

Les cellules iTR35 sont des lymphocytes TCD4+ régulateurs qui ont été décrits chez l'homme pour la première fois en 2011 [673]. En effet, des études ont montrés que les Treg humains sécrétaient des quantités importantes d'IL35 pour une activité suppressive maximale [674]. Par ailleurs, ces travaux ont montré que l'IL35 produite avait la capacité de convertir des lymphocytes T conventionnel en iTreg sécréteurs d'IL35 qui ont alors été appelé iTr35 [673]. L'IL35 est une cytokine immunosuppressive constituée de deux sous unité : l'EBI3 (Epstein Barr virus induced gene3) ou IL-27A et IL-12p35 ou IL-12A [673]. Les études montrent que l'activité immunosuppressive de l'IL35 passe par l'activation des récepteurs IL-12R β 2 et gp130 (glycoprotéine 130) qui favorisent l'expression des facteurs de transcription STAT1/4 [675]. Les

mécanismes d'actions de ces cellules ne sont pas encore bien connus mais certaines études ont montré que iTreg peuvent inhiber les réponses anti-infectieuses et favoriser la propagation des infections [676].

▪ **Les autres Lymphocytes T régulateurs induits :**

Des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+FOXP3+ peuvent également être induits en périphérie à partir de cellules TCD4+FOXP3- (voir figure 34) [677]. En effet, suite à une stimulation de leur TCR et en présence de TGF-β, les lymphocytes TCD4+CD39+ naïfs peuvent exprimer les marqueurs CD25 et FOXP3 [678, 679]. Ces cellules expriment certains marqueurs des Treg dérivés du thymus. Les iTreg FOXP3+ inhibent les réponses immunes *via* la sécrétion de cytokines IL-10 et TGF-β ou par des mécanismes contact-cellulaires dépendants [680]. Néanmoins, des études récentes suggèrent que le marqueur Hélios pourrait être utilisé pour différencier ces iTreg des Treg dérivés du thymus car ces iTreg générés *in vitro* n'exprimeraient pas la molécule Hélios [679]. La figure 34 montre l'ontogénèse des lymphocytes Treg naturels et Treg induits.

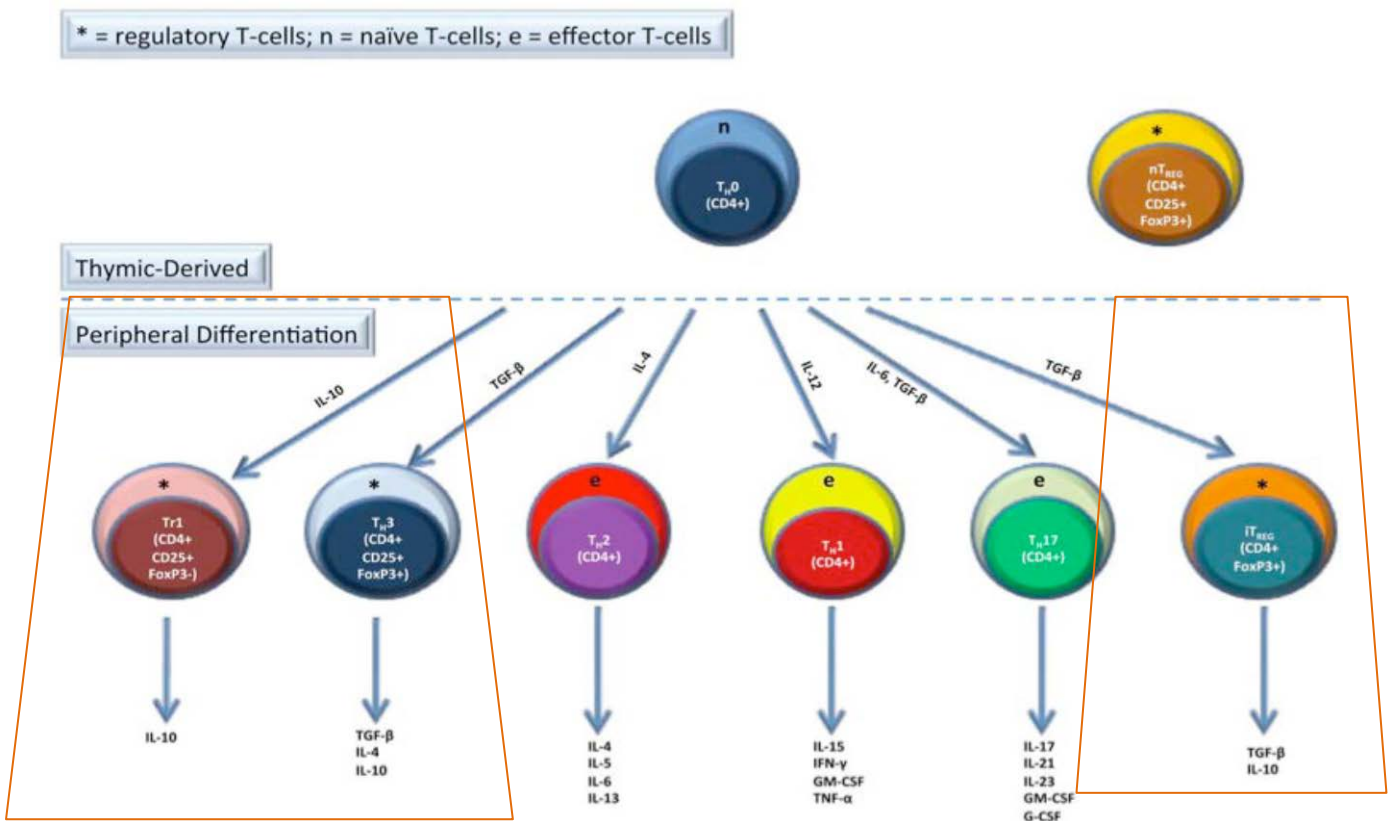


Figure 34 : Ontogénèse des lymphocytes T régulateurs naturels et des lymphocytes T régulateurs induits. Les lymphocytes T naturels CD4+CD25+FOXP3+ (nTreg) sont directement générés dans le thymus. Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) (*carré orange*) peuvent être générés en périphérie à partir de TCD4+ naïfs pour donner des Tr1 IL-10+, les Th3 TGF-β+ et les autres iTreg FOXP3+. Adapté de *Peterson, R. toxicol pathol. 2012.*

b- Les lymphocytes T régulateurs naturels

Les lymphocytes T régulateurs naturels ou nTreg représentent la population de Treg la mieux décrite. Ce sont des lymphocytes T CD4+ sélectionnés directement dans le thymus et dont le TCR possède une affinité modérée pour les antigènes du soi [423]. Ces cellules régulatrices sont donc spécifiques des antigènes du soi et ils représentent 5 à 10% du pool de lymphocytes TCD4+ périphériques [617, 624, 681]. Les Treg naturels (nTreg) ou Treg sont caractérisés par une expression constitutive du CD25 et l'expression concomitante d'un ensemble de marqueurs que sont le CTLA4, le LAG3, le GITR, le CD44 et le FOXP3 dont le niveau d'expression corrèle avec leurs fonctions suppressives [682-684]. Ces cellules sont également caractérisées par la faible expression ou l'absence d'expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (CD127) [684]. Chez la souris, l'ontogénie des Treg est extrêmement précoce après la naissance ce qui montre bien leur rôle dans le contrôle de l'auto-immunité [616]. Ces Treg nécessitent de l'IL-2 pour leur prolifération et ils suppriment la réponse immune principalement *via* des mécanismes contact-cellulaires dépendants (CTLA4, LAG3, GITR, etc.) mais également *via* la sécrétion de nombreuses molécules immunosuppressives (IL-10, TGF- β , IL35, granzymes, perforines, etc.) [685]. Par ces mécanismes, les nTreg inhibent le développement de maladies inflammatoires chroniques, inhibent le développement de maladies auto-immunes et favorisent la tolérance périphérique [685]. Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cette population seront détaillées dans le *chapitre E*.

Le tableau 9 représente les marqueurs principaux associés aux principales populations de lymphocytes TCD4+ régulateurs.

Marqueurs	Treg naturels	Tr1	Th3	iTr35
CD25	+++	+/-	+/-	
FOXP3	+++	+/-	+/-	-
GITR	++	+		
CTLA4	++	++	+/-	
Lag3	+	++	-	
CD49b	-	+++	-	
CD18	-	+++	-	
CD127	-/low	low/-	+	
CD39	+	+		
CD73	+	+/-		
OX40	+	++		
Blimp1		++		
GITR	+	+		
Cytokines				
IL-10	+	+++	+	-
TGF β 1	+	++	+++	-
IL-4		-/low	+	
IFN γ	low	+		
IL-5		+/medium		
Granzyme A	+/-	++		
Granzyme B	+/-	++		
IL-17	+	+		
IL-2	-/low	-/low		
IL35	+			+++
PD1	+	+		

Tableau 9 : Expression des marqueurs et cytokines spécifiques des lymphocytes TCD4+ régulateurs. Les lymphocytes T CD4+ régulateurs naturels sont caractérisés par l'expression constitutive du CD25, et l'expression concomitante du FOXP3 et du GITR mais une sous expression ou une absence d'expression du CD127. En fonction des marqueurs membranaires exprimés et en fonction des cytokines produites, on distingue 4 sous populations de lymphocytes T régulateurs induits: Tr1 producteurs d'IL-10, les Th3 producteurs de TGF- β , les iTR35 producteurs d'IL35 et les autres iTreg. *D'après Laurissa Ouaguia, 2015*

Mon travail de thèse a plus particulièrement porté sur l'étude de l'impact du VHC sur deux sous-populations de lymphocytes TCD4+ régulateurs : les Tr1 et les lymphocytes T régulateurs naturels CD4+CD25+CD127-FOXP3+ qui seront définies plus précisément dans les chapitres suivants.

DI/ LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS INDUITS DE TYPE 1

1- Définition :

Comme leur nom l'indique, les lymphocytes T régulateurs induits ou iTreg sont des cellules différenciées en périphérie sous l'action de certaines cytokines ou en présence d'une exposition à un antigène [686]. Ces cellules sont encore appelées lymphocytes T régulateurs extra-thymiques [687]. La sous population la plus connue et la mieux décrite est constituée des lymphocytes T régulateurs de type 1 ou Tr1 [662]

2- Caractérisation phénotypique et fonctionnelle

Pendant longtemps, aucun marqueur spécifique ne permettait de caractériser phénotypiquement les Tr1. En effet, bien que les molécules GATA-3, Erg-2 et Blimp-1 aient été proposés comme marqueurs des Tr1, aucune étude n'est parvenue à montrer sa spécificité au lignage Tr1 [688]. Néanmoins, ces molécules seraient essentielles au développement des cellules régulatrices sécrétrices d'IL-10 [689]. Des études plus récentes suggèrent que les Tr1 murins et humains seraient phénotypiquement caractérisés par l'expression concomitante des marqueurs CD4, CD49b (intégrine $\alpha 2$), LAG-3, CD122/132 (IL2R), GITR, CD134, PD1, CD18, CD39 et CD73 [686, 690-692]. Bien que l'expression du facteur de transcription FOXP3 soit retrouvée chez les Tr1, il ne semble pas affecter la fonction suppressive de ces cellules [693, 694]. Par contre, une étude récente montre que d'autres facteurs de transcription tels que HIF1- α (hypoxia inducible factor 1 α) et AHR (hydrocarbon receptor) dirigeraient la différenciation des Tr1 [695]. En outre, les Tr1 semblent exprimer différents récepteurs que sont CXCR-3 (Chemokine, CXC Motif, Receptor), CCR-5, CCR-3, CCR-4 et CCR-8 ainsi que des molécules d'activation CD40L, CD69, CD28, CTLA-4, CD25, IL-15R α et HLA-DR [696-698].

Les Tr1 présentent un profil cytokinique caractérisé par la sécrétion importante de cytokines immunosuppressives telles que IL-10 et TGF- β , une sécrétion modérée d'IL-5 et IL-4 mais des quantités minimales d'IFN- γ , d'IL-17 et d'IL-2 ce qui en fait un lignage bien distinct des Th1, Th2 et Th17 [663]. Les cellules Tr1 seraient anergiques *in vitro* même après stimulation de leur TCR et cet état est attribué à l'effet autocrine de l'IL-10 et à la faible production d'IL-2 [699]. La cytokine IL-10 joue donc un rôle central dans leur différenciation en coopération avec l'IFN- α produit par les pDC [700]. En effet, l'IL-10 est indispensable à la génération de Tr1 par son action sur les DC

immatures ou matures grâce à l'engagement du HLA-G (human leucocytes antigen G) des Tr1 avec ILT4 (immunoglobulin like transcript) des DC [700, 701]. En outre, d'autres études montrent que les Tr1 libèrent du granzyme B et de la perforine pour tuer les cellules de la lignée myéloïde [691]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que la prolifération des Tr1 était dépendante de nombreuses cytokines mais particulièrement de l'IL-15 [702, 703]. Les cellules Tr1 sont abondamment recrutées dans les sites d'inflammations où elles inhibent les réponses anti-infectieuses et l'auto-immunité, favorisant ainsi la tolérance périphérique [652]. De plus, les Tr1 inhibent les lymphocytes T naïfs auto-réactifs ayant échappé à la sélection thymique en induisant une inhibition de la production d'IL-2 [691].

Les Treg suppriment la réponse immune principalement *via* des mécanismes cytokines dépendants (IL-10 et TGF- β) [704]. Le rôle de l'IL-10 dans l'immunosuppression des Tr1 peut être expliqué par des mécanismes directs et indirects tels que (i) l'inhibition de l'expression des molécules CMH de classe II, des molécules de co-stimulation et des molécules d'adhésion, (ii) l'inhibition de la présentation antigénique et (iii) l'inhibition de la capacité des cellules T à produire des cytokines et à proliférer [705]. Néanmoins, d'autres mécanismes de suppression semblent également exister : l'induction de la lyse des CPA par production de granzymes et perforines ; l'engagement du récepteur CD226 des Tr1 et ses ligands cellulaires ; la génération de l'AMP grâce à la présence des molécules CD39 et CD73 et l'engagement des mécanismes contact-cellulaires dépendants (CTLA4, PD1, GITR) [686, 695, 704]. La stimulation des Tr1 est spécifique de l'antigène, mais leur effet suppresseur peut affecter toutes les cellules environnantes car leur activité est principalement dépendante de la sécrétion de cytokines. Par ces mécanismes, les Tr1 inhibent le développement des réponses immunes adaptatives, inhibent le développement de maladies auto-immunes, favorise la tolérance périphérique mais surtout favorise la tolérance après transplantation [706].

1- Définition

Les lymphocytes T régulateurs naturels ou Treg sont caractérisés par leur aptitude à réguler ou supprimer la réponse immune. Ce sont des lymphocytes T CD4+ sélectionnés directement dans le thymus dont le TCR possède une affinité modérée pour les antigènes du soi [423]. La signalisation cellulaire de ces cellules provient donc des interactions entre leur TCR et les antigènes du soi présentés par les molécules de CMH de classe II exprimées à la surface des CPA thymiques [417]. L'origine thymique de ces cellules a été confirmée chez la souris, après de nombreuses observations. En effet, une thymectomie chez les souriceaux trois jours après leur naissance a conduit au développement de maladies auto-immunes sévères (MAI) [616]. Cependant, le transfert adoptif de cellules CD4+CD25+ a permis d'inhiber le développement de MAI [616]. Ces travaux ont ainsi suggéré l'existence d'une population cellulaire CD4+CD25+ présentes dans le thymus et capables de réguler les réponses immune inflammatoires. Plus récemment d'autres études ont montré que le transfert adoptif des cellules CD4+CD25+ favorise la tolérance des greffons et contrôle le développement des GvD (graft versus host disease) [707]. Ainsi, les Treg naturels jouent un rôle primordial dans le maintien de la tolérance du soi et dans le contrôle des maladies auto-immunes [653, 708, 709].

Les Treg naturels peuvent proliférer *in vivo* mais ces cellules sont anergiques *in vitro* [710]. Néanmoins, diverses études montrent que la présence d'IL-2 recombinante associée à une forte costimulation avec des anticorps monoclonaux anti-CD28 et une stimulation mitogénique par l'anti-CD3 (court-circuitant le TCR) peut lever leur état anergique et induire leur prolifération [710]. Plusieurs études ont montré que la régulation médiée par les Treg était dépendante d'un apport continu en auto-antigènes ou alloantigènes [711, 712]. En effet, de part la diversité de leur répertoire TCR, les Treg naturels sont capables de reconnaître à la fois les antigènes du soi et du non soi [713, 714]. Ainsi, les Treg naturels jouent un rôle clé dans la réponse immune. Ces Treg sont capables de supprimer la prolifération et la production cytokinique des cellules T effectrices CD4+ et CD8+, en inhibant notamment la transcription du gène de l'IL-2, et en inhibant la prolifération et la production d'anticorps par les lymphocytes B [486, 715]. Ainsi, ils participent à la régulation de l'homéostasie lymphocytaire [707] et modulent les réponses immunitaires contre les alloantigènes, les pathogènes et les cancers [716]. Il n'existe pas de « réels » marqueurs spécifiques de cette population mais ils peuvent être caractérisés sur la base de l'expression concomitante d'un ensemble de marqueurs phénotypiques et fonctionnels.

2- Caractérisation phénotypique

Comme décrit plus haut, les lymphocytes T régulateurs naturels ont été découverts en 1969 puis nommés par les Dr. Gershon et Khondo : « lymphocytes T suppresseurs » [613]. Cette population a fait l'objet de nombreuses études mais c'est en 1985 que des premières études ont apporté les preuves convaincantes de l'existence de ces cellules T suppressives, notamment dans le contexte des pathologies auto-immunes [614]. En effet, ces études ont tenté de caractériser cette population et leurs résultats ont montré que les lymphocytes T suppresseurs possédait le phénotype CD4+CD5^{high} (ou Lyt-1^{high}) [717]. CD5 est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des scavenger receptor qui est fortement exprimée dans les lymphocytes T matures et ligand potentiel de CD72. Ces études ont montré qu'une déplétion des lymphocytes TCD4+ murins en cellules T CD4+CD5^{high} et une réinjection de la fraction résiduelle CD4+CD5⁻ chez la souris conduisait au développement de pathologies auto-immunes sévères. Mais la reconstitution du système immunitaire avec les cellules T CD4+CD5^{high} prévenait le développement de ces pathologies [614].

D'autres études réalisées en 1993 ont suffi à confirmer la présence d'une population de lymphocytes TCD4+, différente des lignages Th1 et Th2 et possédant la capacité d'inhiber le développement des maladies auto-immunes [615]. Ces études ont proposé la molécule CD45RB comme marqueur de cette population régulatrice. En effet, leur travaux ont montré que l'injection de la sous-population T CD4+CD45RB^{high} à des rats thymectomisés induisait le développement de pathologies auto-immunes multi-organes et une perte de poids, alors que le transfert adoptif de la fraction cellulaire T CD4+CD45RB^{low} n'était pas pathogénique. Ils ont également montré que cette fraction CD45RB^{low} était minoritaire au sein des TCD4+. Ainsi, même minoritaire, la population T CD4+CD45RB^{low} semblait capable de contrôler la population effectrice T CD4+CD45RB^{high} [718]. De plus, en 1993, des études ont montré que le transfert de lymphocytes T CD4+CD45RB^{high} favorisait le développement d'une pathologie inflammatoire auto-immune de l'intestin (IBD : Inflammatory Bowel Disease), et que l'injection de la fraction autologue T CD4+CD45RB^{low} ou bien la co-injection des fractions T CD4+CD45RB^{high} et T CD4+CD45RB^{low} n'induisait pas l'IBD. Ces études suggèrent que les cellules suppressives se trouvent bien dans la population CD4+CD45RB^{low} [719].

C'est en 1995 que la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (IL-2R α ou CD25) a été proposée comme marqueur de surface des lymphocytes T régulateurs naturels par le Dr. Sakaguchi [616]. Cependant, plusieurs études montrent que l'activation des lymphocytes T conventionnels CD4+ conduit également à l'expression du marqueur CD25 [720]. Néanmoins, en fonction du niveau

d'expression, on peut clairement distinguer les lymphocytes T conventionnels activés (qui expriment transitoirement le CD25 : CD25⁺), des lymphocytes T régulateurs naturels (qui l'expriment de manière constitutive, stable et à des niveaux très élevés : CD25^{high}) [681, 720]. Ainsi, bien que 5-10% des TCD4⁺ périphériques expriment le marqueur CD25, seuls les lymphocytes CD4⁺CD25^{high}, qui ne représentent que 2 à 3% des lymphocytes TCD4⁺, seraient des Treg [617, 721]. En 1998, la capacité suppressive des Treg naturels a été mise en évidence *in vitro* [722]. En effet, les études ont montré que les cellules CD4⁺CD25⁺ co-cultivées avec des cellules CD4⁺CD25⁻ en présence d'antiCD3, inhibaient la prolifération des cellules T conventionnelles CD4⁺CD25⁻ et leur capacité à produire de l'IL-2 [722]. De nos jours, le CD25 (IL-2R α) reste encore l'un des marqueurs de surface les plus utilisés pour caractériser les lymphocytes T régulateurs naturels, car son expression corrèle avec l'activité suppressive des Treg [723]. Ce marqueur est d'autant plus important que de nombreuses études ont montré que la cytokine IL-2 est essentielle à la génération des Treg dans le thymus, leur survie, leur expansion et leur fonctions suppressives en périphérie [703, 724]. En effet, les souris IL-2^{-/-} et des souris IL-2R^{-/-} développent des pathologies lympho-prolifératives et auto-immunes associées à un défaut de fonctionnement des Treg [725].

En 2001, un autre marqueur essentiel généralement associé au Treg a été découvert : le facteur de transcription FOXP3 (forkhead/winged-helix protein3) [726, 727]. Son induction aurait lieu au cours de la différenciation thymique au stade simple positif ce qui favorise la notion selon laquelle les Treg naturels ont une origine thymique [728]. Le marqueur FOXP3 a été identifié comme l'agent du gène causatif de la pathologie multi-organe auto-immune conduisant au développement de désordres inflammatoires chez les souris mutantes [727]. En effet, la mutation du gène codant pour le facteur de transcription FOXP3, situé sur le chromosome X, entraîne chez la souris le développement de nombreuses pathologies auto-immunes semblables au lupus (souris *Scurfy*) [729]. Chez l'homme des cas de mutations du *Fopx3* ont été identifiés. Ces mutations conduiraient au développement d'une maladie auto-immune appelée syndrome IPEX (immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) [730]. Contrairement au modèle murin, les patients présentant le syndrome IPEX ont un taux de Treg naturels identique aux donneurs sains. Cependant, les tests fonctionnels *in vitro* montrent que ces Treg CD4⁺CD25^{high} des patients IPEX (FOXP3⁻) présentent une diminution de leur potentiel suppresseur [450].

En 2003, des études ont montré que l'expression du facteur de transcription FOXP3 était spécifique des cellules T conventionnelles CD4⁺CD25⁺ chez la souris car la transfection des cellules T CD4⁺CD25⁻ avec le gène FOXP3 leur conférait des propriétés régulatrices [731]. Ces découvertes ont mis en évidence le rôle crucial du FOXP3 dans le lignage Treg. En effet, de

nombreuses études ont décrit l'expression prédominante de la protéine et de l'ARN messager de FOXP3 dans les Treg CD4+CD25+ localisés dans le thymus et en périphérie [732, 733]. Par ailleurs, une mutation fonctionnelle du FOXP3 chez la souris semble inhiber le développement de lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ fonctionnels, cause du développement des maladies auto-immunes [732]. Ainsi, le facteur de transcription FOXP3 représente un marqueur moléculaire spécifique des Treg murins, essentiel pour leur développement et pour l'acquisition de leur activité suppressive [734]. Par ailleurs, il serait essentiel à la tolérance du soi [735]. Néanmoins, bien que le facteur de transcription FOXP3 soit le marqueur qui ait permis d'identifier clairement les Treg murins, il n'est pas le marqueur « universel » des Treg chez l'Homme, en particulier depuis que son expression a également été retrouvée dans les cellules CD4+CD25- activées [736]. En effet, on peut noter une augmentation transitoire du marqueur FOXP3 sur les lymphocytes T effecteurs activés même si leur niveau d'expression reste inférieur à celui des Treg [736]. Par ailleurs, ces T activés ne semblent pas développer de propriétés suppressives et la déplétion du FOXP3 dans ces cellules n'altère ni leur phénotype, ni leur fonction [736]. De plus, le facteur de transcription FOXP3 ne peut pas être utilisé comme marqueur membranaire des Treg car il est intracellulaire, ce qui complique l'étude phénotypique de ce marqueur sur des cellules vivantes. Ainsi, bien que les Treg humains expriment le FOXP3, ce marqueur ne serait pas indispensable à leur activité suppressive [737]. Néanmoins, le facteur de transcription FOXP3 assure le contrôle et la régulation transcriptionnelle des niveaux d'expression de nombreuses molécules dans les Treg, favorisant ainsi les fonctions et l'homéostasie des Treg [738]. Ainsi, l'IL-2, le FOXP3, et le CD25 sont des molécules essentielles au développement, à la fonction et à la survie des cellules Treg car des études ont montré qu'une mutation ou un polymorphisme dans les gènes codant une de ces molécules peut causer ou prédisposer les sujets murins et humains aux MAI [739].

En 2006, un pas important dans la discrimination des Treg a été franchi avec le travail de diverses équipes de recherche qui ont mis en évidence le fait que les Treg CD4+CD25+FOXP3+ étaient CD127^{low} alors que les lymphocytes T effecteurs activés (CD25+) ou non activés (CD25-) étaient CD127^{high} [740, 741]. Le CD127 est un constituant de la chaîne α du récepteur à l'IL-7. Un niveau d'expression faible du CD127 semble indiquer que contrairement aux autres populations de lymphocytes T, les Treg n'ont pas besoin de la cytokine IL-7 pour proliférer et se maintenir en périphérie [742]. En effet, la prolifération des Treg est principalement fonction de l'IL-2 d'où les niveaux d'expression élevé du récepteur IL-2R α (CD25) [743]. De nombreuses études montrent que la population de Treg TCD4+CD25+CD127^{low} augmente avec l'âge. En effet, elle serait de 6.10% à la naissance, 7.22 % chez l'homme adulte de 20-25 ans et de 7.50% chez les plus de 60 ans [744]. En fonction de l'expression très élevée du CD25, les Treg CD25^{high}CD127^{low} représenteraient

environ 0.6% à 7.9% des CD4+ périphériques chez l'homme adulte [745]. Par ailleurs, d'autres études montrent que dans la population T CD4+CD25+, il y a une très forte corrélation entre l'expression du FOXP3 et la faible expression du CD127. La surexpression du FOXP3 dans une souris transgénique conduit au développement de populations Treg CD127^{low} homogènes et fonctionnelles [745]. Le CD127 serait donc un meilleur marqueur des Treg que le FOXP3 car il est membranaire et son marquage ne nécessite pas de fixation et/ou perméabilisation cellulaire conduisant à la mort des cellules [745]. Ainsi, en combinaison avec le CD25, les marqueurs CD4 et CD127 peuvent servir à l'isolement de cellules Treg purifiées qui pourront ensuite être mises en culture [746]. Des études récentes ont montré que plus de 25% des cellules humaines CD127^{low}/- n'exprimaient pas le marqueur FOXP3 et inversement, 23% des cellules CD127⁺ exprimaient les facteurs de transcription FOXP3⁺ [747]. La présence de ces cellules CD4+CD127^{low}/-FOXP3⁻ et CD4+CD127⁺FOXP3⁺ laisserait penser qu'il s'agit de lymphocytes Treg induits (iTreg) [677, 747].

Des études plus ou moins récentes suggèrent que les Treg naturels expriment également les marqueurs membranaires suivants : CTLA-4 (cytotoxic T lymphocytes associated protein 4), CD62L (L-selectine), CD44, LAG3 (lymphocytes activating gene3) et GITR (Glucocorticoid Induced TNFR-Related gene) [682-684, 748]. De plus, les nTreg expriment également les molécules CD39, CD73, ICOS, CD103 et CD45RO [749-751]. En effet, les Treg sont généralement CD62^{high} et CD45RO^{high}. Par ailleurs, il y aurait une accumulation préférentielle de Treg CD103⁺ au niveau des ganglions lymphatiques drainant de souris porteuses de tumeurs [752]. En outre, l'expression de LAG-3 sur des cellules CD4+CD25+FOXP3⁺ a permis de définir une population de cellules régulatrices sécrétrices d'IL-10 et de TGF- β , qui est abondamment recrutée au site tumoral et dans le sang de patients atteints de cancer [753]. Les Treg expriment également des récepteurs de chimiokines tels que CCR-2, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-8, CCR-9, CCR-10, CXCR-3, CXCR-5, CXCR-4 et CXCR-6 qui favorisent leur « homing » au niveau des sites d'inflammation ou des tumeurs [682]. En effet, des études transcriptomiques ont révélés une modification de l'expression génique de ces récepteurs qui était proportionnelle à la réponse immune supprimée. Par ailleurs, l'expression du facteur de transcription TBET dans les Treg est également associée à la suppression de la réponse Th1 [754]. Tandis que l'expression des facteurs STAT3 et IRF4 serait responsable de la suppression des réponses Th17 et Th2 respectivement [755, 756]. Par ailleurs, d'autres études montrent que les Treg expriment les marqueurs galectine-1, galectine 9 et galectine 10 (β -galactoside-binding protein), neuropiline 1 et TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2) important pour l'activité suppressive des Treg [757-759].

3- Caractérisation fonctionnelle

Les lymphocytes T régulateurs sont aussi caractérisés sur la base de leur capacité à inhiber la réponse immune par des mécanismes divers tels que :

- la sécrétion de quantités importantes de cytokines immunosuppressives ;
- l'inhibition de la présentation antigénique par les cellules dendritiques et l'inactivation cellulaire par des mécanismes contact-cellulaires dépendants ;
- les perturbations du métabolisme cellulaire par des mécanismes contact-cellulaires dépendants ;
- l'induction de la cytolysse cellulaire par la sécrétion des facteurs cytotoxiques.

3.1- Les mécanismes dépendants de la sécrétion des cytokines immunosuppressives

Les Treg se caractérisent par une sécrétion importante des cytokines immunosuppressives IL-10, TGF- β et IL35 [646, 760]. La figure 35 montre le mécanisme d'action des Treg par la sécrétion de ces cytokines immunosuppressives

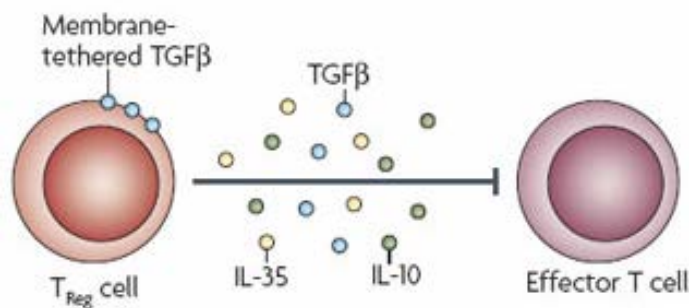


Figure 35 : les Treg sécrètent les cytokines immunosuppressive IL-10, TGF- β et IL35 pour inhiber la fonction des cellules effectrices. D'après Vignali D.A, *Nature reviews immunology*, 2008.

a) L'IL-10

L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive et anti-inflammatoire importante pour l'activité régulatrice des Treg [761]. En effet, de plus en plus d'études ont montré que l'IL-10 pouvait réduire le recrutement des neutrophiles et inhiber le développement de l'inflammation après une infection

[762]. Par ailleurs, les modèles de colites intestinales et d'infections montrent que l'IL-10 est cruciale au maintien de l'homéostasie immune et à la régulation médiée par les Treg [763]. En outre, les anticorps monoclonaux anti-IL-10 ou anti-IL-10-R semblent diminuer l'induction de la tolérance périphérique et favoriser le rejet de greffes dans des modèles de transplantation [764, 765]. La cytokine IL-10 est produite par de nombreux types cellulaires tels que les cellules T, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales. Elle possède des effets pleiotropes car régule les cellules B, T, NK, les DC et les mastocytes [766]. L'engagement de l'IL-10 sur son récepteur IL-10R conduit à l'inhibition de la prolifération, l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires et l'inhibition de la maturation et de la présentation antigénique [767, 768]. L'IL-10 joue également un rôle pivot dans la fonction cellulaire des Treg. En effet, des études récentes montrent que les souris IL-10 KO développent spontanément des pathologies inflammatoires intestinales, ressemblant à la maladie de Crohn, qui peuvent être dues à une fonction régulatrice réduite des Treg présents [769]. Par ailleurs, d'autres équipes ont montré, dans un modèle de colite médié par les lymphocytes T, que l'inflammation intestinale due aux cellules T CD4+CD25- pouvait être guérie par transfert adoptif de cellules Treg CD4+CD25+. Dans ce modèle murin, durant la guérison de la colite, les cellules TCD4+CD25+FOXP3+ sécrétrices d'IL-10 s'accumulaient abondamment dans le colon et dans les organes lymphoïdes secondaires [770]. Cependant, l'administration d'un anticorps monoclonal anti-IL-10R aux souris ayant reçu un transfert adoptif de Treg abolissait complètement cette guérison. Par ailleurs, l'analyse des différents pools de Treg a montré que les Treg infiltrant l'intestin produisaient de l'IL-10 contrairement aux Treg spléniques, ce qui suggère que l'environnement peut influencer le profil de sécrétion des Treg et les fonctions suppressives mises en place [770]. De plus, d'autres études montrent que l'inhibition par siRNA de la production d'IL-10, empêche les Treg d'exercer leur activité suppressive sur la prolifération des cellules T naïves xenogéniques [771]. Cependant, cette inhibition n'a eu aucun effet ni sur le phénotype des Treg CD4+CD25+, ni sur la sécrétion du TGF- β , ni sur leur capacité à supprimer les cellules T allogéniques [771]. Ces découvertes ont été confirmées chez l'homme, dans les tumeurs de CHC, où des cellules Treg CD4+CD25^{high}FOXP3+ productrices d'IL-10 ont été retrouvées dans le sang et favorisaient la progression de la maladie [772].

b) Le TGF- β

La cytokine TGF- β est une protéine anti-inflammatoire et immunosuppressive qui module la réponse immune *via* des effets pleiotropes. On distingue trois isoformes de TGF- β chez les mammifères : TGF- β 1, - β 2 et - β 3 [773]. Mais seule l'isoforme TGF- β 1 a été clairement identifiée

comme molécule immuno-régulatrice [774]. Le TGF- β fait partie d'une famille de polypeptides impliqués dans le contrôle de la croissance, la production et le développement de la matrice extracellulaire [774]. Une déficience de TGF- β ou de son récepteur provoque un syndrome lymphoprolifératif similaire à ce qui est induit chez les souris FOXP3null [775]. Dans la biologie des Treg, le TGF- β est important pour l'homéostasie ainsi que pour la régulation de nombreuses fonctions effectrices [776]. En association avec l'IL-10, le TGF- β favorise l'émergence de nouvelles populations régulatrices à partir des T effecteurs, responsables de la tolérance infectieuse. En effet, des études ont montré que les Treg activés expriment le complexe LAP/TGF- β qui participerait directement à la conversion des T conventionnels en iTreg [777]. Par ailleurs, les Treg TGF- β + peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs et favoriser leur conversion en iTreg, en particulier dans le CHC [495, 778]. En outre, d'autres études montrent que le TGF- β induit et maintient l'expression de FOXP3 *in vivo et in vitro* dans les Treg et les iTreg [779].

La protéine TGF- β peut être sécrétée ou rester accrochée à la membrane (voir figure 35) [646]. Ainsi, les Treg TGF- β + peuvent inhiber la réponse immune de façon spécifique *via* des mécanismes contact-cellulaires dépendants (TGF- β /TGF- β R) ou de façon plus large *via* la sécrétion du TGF- β [778]. Des études ont montré que l'injection de Treg isolés dans les souris TGF- β 1-/- inhibaient le développement de la colite et que l'ajout d'anticorps bloquants anti-TGF- β était incapable de prévenir le développement de la pathologie [780]. Par ailleurs, ces travaux ont montré que les cellules T CD4+CD45RB^{high} effectrices exprimant un variant dominant négatif du récepteur TGF- β RII échappaient au contrôle des Treg *in vivo*, suggérant ainsi que les cellules T CD4+CD45RB^{high} effectrices sont la cible directe du TGF- β [780]. En outre, des travaux ont analysé l'impact spécifique des Treg TGF- β + sur la fonction cytotoxique des CTL *in vivo*. Leurs résultats montrent que les Treg inhibent la fonction lytique des CTL de manière TGF- β 1-dépendante mais cette inhibition ne semble affecter ni la prolifération, ni la production d'IFN- γ par les CTL [781]. D'autres études ont montré que l'administration d'un peptide synthétique inhibiteur du TGF- β 1 et TGF- β 2 abrogeait l'activité régulatrice des Treg murins et humains *in vitro* [782]. En effet, l'utilisation de ce peptide semblait favoriser les réponses anti-tumorales et infectieuses et inhibait l'activité des Treg [782]. De plus, il a été montré que les Treg TGF- β + pouvaient inhiber la cytotoxicité des cellules NK et diminuer le niveau d'expression du récepteur activateur NKG2D à leur surface [783]. Par ailleurs, ils peuvent d'inhiber les réponses inflammatoires Th1 et Th17 [784]. L'importance du TGF- β dans la régulation médiée par les Treg a également été rapportée dans un modèle d'hépatite fulminante, où les auteurs ont montré que la présence des cellules régulatrices T CD4+CD25+FOXP3+ protégeait le foie contre le développement d'une hépatite fulminante favorisée par les lymphocytes T pro-inflammatoires [785]. De plus, l'injection d'un

anticorps bloquant anti-TGF- β semble conduire à une inhibition de l'activité des Treg, et semble favoriser le développement des T effecteurs qui aggraveraient la destruction du foie [785]. L'ensemble de ces travaux a permis de montrer l'importance des TGF- β dans les mécanismes de régulation des Treg.

c) L'IL35

L'IL35 est une cytokine immunosuppressive qui a été décrite sur les Treg pour la première fois en 2007 [786]. En effet, les travaux ont montré que l'IL35 favorisait l'expansion des Treg CD4+CD25+FOXP3+ et augmentait la sécrétion de l'IL-10. Par ailleurs, leur travaux ont permis de montrer que l'utilisation de l'IL35 pouvait permettre l'expansion *in vitro* des Treg capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T conventionnels CD4+CD25- et de diminuer la production d'IFN- γ et d'IL-17 [786]. D'autres études confirment que la cytokine IL35 participe aux mécanismes de suppression des Treg en potentialisant les mécanismes contact-cellulaires dépendants et en augmentant la sécrétion de l'IL-10 [787, 788]. Néanmoins, les Treg CD4+CD25+FOXP3+ ne semblent pas exprimer constitutivement l'IL35 [789]. La protéine IL35 est composée d'un hétérodimère de deux sous unités EB13 (Epstein-Barr virus-Induced gene 3) ou chaîne β de l'IL-27 et l'IL-12p35 (sous unité p35 de l'IL-12) encore appelée IL-12A [787]. Les mécanismes suppresseurs de cette cytokine sont principalement indirects car ils favorisent principalement l'expansion des Treg naturels CD4+CD25+ [790]. Des études plus récentes suggèrent que les Treg IL35+ seraient essentiels à la tolérance fœto-maternelle [791].

3.2- Les mécanismes contact-cellulaires dépendants

Les analyses *in vitro* ont montré que les Treg inhibaient l'activation des cellules T effectrices par un mécanisme cellulaire contact-dépendant plutôt que par des médiateurs solubles, mais *in vivo*, la suppression semble passer par les deux mécanismes [722, 792]. Des études montrent qu'en l'absence totale de CPA, les Treg activés peuvent directement interagir avec les T effecteurs notamment *via* leurs molécules de surface afin de favoriser la suppression de la prolifération des T effecteurs *in vitro* [793]. Cependant, *in vivo*, il est probable que des interactions plus complexes entre Treg, T effecteurs et CPA puissent déterminer la réponse immune résultante. Ainsi, par l'interaction des molécules membranaires des Treg avec les molécules de surface des cellules cibles, les Treg peuvent perturber le métabolisme cellulaire ou inhiber la présentation antigénique des DC [646].

a- Perturbation du métabolisme cellulaire

Les Treg perturbent le métabolisme cellulaire principalement par déprivation du milieu environnant en IL-2, conduisant à la mort des cellules par apoptose [646]. En effet, les Treg expriment fortement la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) sans produire de l'IL-2 ce qui les rend dépendants de l'IL-2 environnemental produit par les autres cellules [794]. Pour leur homéostasie et pour leur prolifération, les Treg consomment donc d'importantes quantités de la cytokine proliférative IL-2. Pour ce faire, les Treg entrent en compétition pour l'IL-2 avec les cellules T effectrices et ce processus conduit à la mort par apoptose des cellules T effectrices [793, 795].

Les Treg possèdent également d'importantes quantités nucléaires d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) qu'ils sont capables de transférer aux cellules T conventionnelles par des jonctions intercellulaire GAP [646, 796]. L'AMPc transmis va favoriser l'accumulation d'ICER (Inducible cAMP Early Repressor) dans le noyau des T conventionnels, ce qui va conduire à une diminution de production d'IL-2 et une réduction de la prolifération des lymphocytes T [797, 798].

Les Treg inhibent aussi la réponse immune *via* des contact-cellulaires médiés par les molécules CD39 et CD73 deux enzymes exprimées préférentiellement à leur surface [799]. La molécule CD39 ou ENTPD1 (Ectonucleoside TriPhosphate Diphosphohydrolase-1) est une ectoenzyme qui hydrolyse les ATP/UTP et ADP/UDP en leur nucléoside monophosphate respectifs (AMP/UMP). Les nucléosides monophosphates ainsi générés sont rapidement dégradés en nucléosides (adénosine/uracile) par les nucléotidases solubles ou membranaires telles que le CD73 (Ecto-5-prime-nucleotidase) présent sur les Treg [800]. Ainsi, association avec le CD73, le CD39 peut convertir l'ATP/ADP/AMP en adénosine [799]. Cette adénosine peut se fixer sur son récepteur A2AR exprimé à la surface des cellules T conventionnelles et inhiber leur activation et prolifération *in vivo* et *in vitro* (voir figure 36) [799]. En effet, de nombreuses études ont montré que la régulation du catabolisme extracellulaire de l'adénosine par les Treg pouvait être responsable de la coordination des effets immunosuppresseurs spécifiques de l'adénosine que l'on retrouve quelques fois en cas d'hypoxie [801]. L'accumulation d'adénosine dans le domaine extra- et/ou immédiatement péri-cellulaire provoque, en effet, une réponse cellulaire immunosuppressive qui est médiée par plusieurs récepteurs prurinergiques de type I (à adénosine) tels que l'A2AR [802, 803]. Ainsi, les réponses adénosynergiques engendrées *via* le récepteur A2AR peuvent inhiber la réponse immune et améliorer l'angiogénèse, favorisant ainsi la croissance tumorale [804]. La figure 36 met illustre la perturbation du métabolisme cellulaire par les Treg.

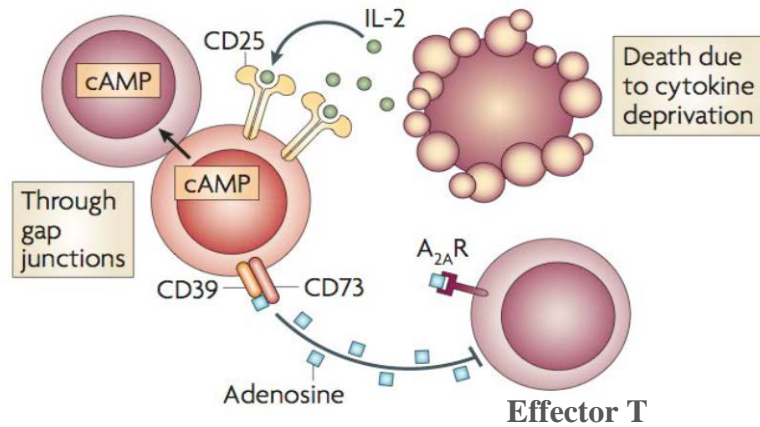


Figure 36 : Les perturbations métaboliques provoquées par les Treg sur leurs cibles. Les Treg sont capables de perturber le métabolisme des cellules cibles notamment en consommant de l'IL-2 disponible dans le milieu. Les Treg peuvent également transférer l'AMPc directement dans le cytoplasme puis dans le noyau des cellules T, ce qui réduira la prolifération de ces derniers. Enfin, les Treg expriment préférentiellement le CD39 et le CD73 qui convertissent l'ATP/ADP/AMP en adénosine qui peut se fixer sur son récepteur A_{2A}R pour inhiber la prolifération des T effecteurs. *Adapté de Vignali, nat rev immunol, 2008.*

b- Inhibition de la présentation antigénique

Les cellules dendritiques sont essentielles pour développer une réponse immunitaire efficace. En interagissant avec elles, les Treg inhibent indirectement la réponse immunitaire [646]. Cette interaction se fait *via* l'expression des marqueurs membranaires suivants : CTLA4, GITR, LAG3, la neuropiline 1 et CD95.

Le CTLA-4 est une molécule fortement exprimé par les Treg qui se lie aux molécules de costimulation CD80/CD86 exprimées par les cellules dendritique et inhibe la présentation antigénique [685]. Lorsqu'il est exprimé à la surface des lymphocytes T, l'activation du CTLA-4 transduit un signal négatif qui atténue la réponse cellulaire [805]. De plus, des études montrent que l'utilisation d'anticorps antiCTLA4 (Ipilimumab) ne réduit pas le nombre de Treg mais diminue leur activité suppressive (voir figure 37) [806].

Le GITR est une molécule également exprimée à la surface des Treg qui joue un rôle non-négligeable dans l'immunosuppression [807]. Egalement appelé CD357 ou TNFRSF18 (tumor necrosis factor receptor super family member18), le GITR est un marqueur d'activation des lymphocytes T en général [807]. Des études ont montré que la culture des Treg murins en présence d'un anticorps anti-GITR et d'IL-2 conduisait à une prolifération importante des Treg CD4⁺CD25⁺ mais pas des lymphocytes TCD4⁺CD25⁻ [808]. Par ailleurs, le GITR fonctionne comme un agoniste des molécules de costimulation (CD28) qui peut se fixer au CPA afin d'accroître

l'activation des Treg [809]. Cependant, la costimulation par le GITR sur des Treg ne semble pas favoriser la sécrétion des cytokines immunosuppressives [810].

LAG3 est une autre molécule associée à la fonction suppressive des Treg [646]. Egalement appelée CD223, LAG3 est une molécule d'adhérence homologue du CD4 qui, comme le CD4, peut se lier à la molécule du CMH de classe II exprimée à la surface des CPA [646, 811]. Des études montrent que le LAG3 est généralement exprimé à la surface des Treg après activation même s'il demeure un marqueur principal des Tr1 [812, 813]. Par ailleurs, son expression serait contrôlée par le facteur de transcription Erg2 (Early growth factor 2) [814]. Chez la souris, l'injection d'anticorps bloquants anti-LAG3 semble inhiber l'activité suppressive des Treg *in vivo*. Par ailleurs, les analyses *in vitro* montrent que les Treg isolés à partir de souris LAG3^{-/-} présentent une activité régulatrice diminuée *in vitro* [811]. Le LAG3 semble donc important pour la fonction suppressive des Treg. En effet, par son interaction de forte affinité avec la molécule de CMH de classe II présent sur les CPA, le LAG3 augmente le temps d'interaction entre les Treg et les DC, diminuant ainsi la maturation des DC et inhibant leur capacité de présentation antigénique (voir figure 37) [815].

La Neuropiline-1 (Nrp-1) est un récepteur protéique exprimé à la surface des Treg naturels [816]. Elle fixe le VEGF (vascular endothelial growth factor), le TGF- β et les sémaphorines de classe 3 et prolonge l'interaction entre les Treg et les DC [817, 818]. Les interactions entre les Treg et les DC peuvent conduire ces dernières à produire de l'IDO, enzyme qui favorise la synthèse des kynurénines qui sont toxiques pour les lymphocytes T effecteurs (voir figure 37) [626].

La Figure 37 présente les mécanismes de suppression des Treg par contacts cellulaires.

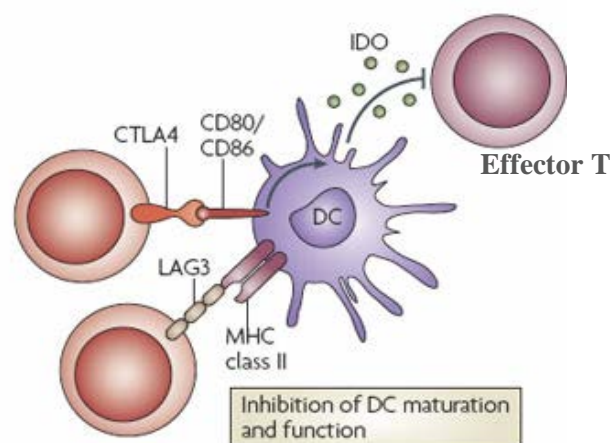


Figure 37 : Mécanisme de suppression des Treg par contact-cellulaire. Les Treg expriment les molécules CTLA4 et LAG3 qui fixent des molécules exprimées par les DC, inhibant la présentation antigénique. Par ailleurs, les Treg peuvent amener les DC à produire l'IDO qui est toxique pour les cellules T conventionnelles. *Adapté de vignali, nat rev immunol, 2008.*

Une autre molécule d'interaction directe des Treg est la protéine CD95. La protéine CD95 ou FAS ou APO-1 est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs du TNF (tumor necrosis factor). Des études ont montré que les Treg expriment la molécule CD95 (Fas) qui se lie à son ligand CD95L (FasL) sur les lymphocytes T, inhibant la prolifération des lymphocytes T effecteurs qui meurent par apoptose [819].

3.3- Les mécanismes dépendant de l'induction de la cytolyse Induction de la cytolyse

Différentes études ont permis de décrire la capacité des Treg FOXP3+ à lyser les cellules effectrices afin de pouvoir contrôler le développement de la réponse immune (voir figure 38). Cette cytotoxicité serait médiée par la production des perforines et des granzymes A et B [646]. En effet, les Treg inhibent également la réponse immune en produisant des granzymes et des perforines pour induire la lyse directe des cellules cibles [820]. Ainsi, des études ont montré que les Treg étaient capables de tuer les DC se trouvant dans la tumeur et dans les ganglions drainants par la voie des perforines/granzymes [821]. Par ces mécanismes, les Treg peuvent inhiber les cellules T effectrices, les monocytes et les cellules dendritiques qui meurent par apoptose [646, 685, 822]. Les Treg peuvent également produire des molécules pro-apoptotiques qui se fixent à leurs ligands respectifs pour induire la mort des cellules effectrices par apoptose. Ces molécules sont : la galectine-1 dont les ligands sont CD7, CD43 et CD45 ; la galectine 9 dont le ligand est TIM3 (T cell immunoglobulin mucin-3) et la TRAIL (Tumor necroses factor Related Apoptosis Inducing Ligand) dont le ligand est DR5 (Death Receptor 5) [823, 824].

La figure 38 illustre le mécanisme de suppression des Treg par induction de la lyse cellulaire.

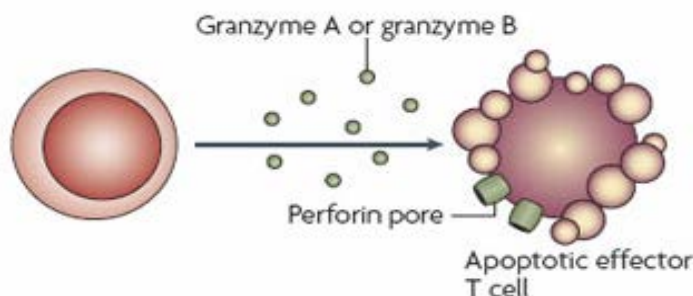


Figure 38 : Mécanisme de suppression des Treg par induction de la lyse cellulaire. Les Treg produisent des granzymes et des perforines qui vont provoquer l'apoptose des cellules T effectrices. *D'après vignali, nat rev immunol, 2008.*

En conclusion, l'ensemble de ces données suggère que les mécanismes de suppression des Treg sont très variés car ils dépendent du type cellulaire régulé, du contexte physiopathologique et surtout de la fonction cellulaire régulée [685]. De nombreuses études ont montré que la stimulation de l'activité suppressive des Treg requière une stimulation antigénique spécifique du TCR par une CPA [825]. Cependant, les mécanismes de suppressions des Treg se font de manière à la fois spécifique et non spécifique de l'antigène [685]. En effet, ces fonctions impliquent non seulement des mécanismes contact-cellulaires dépendants (spécifiques) mais aussi des mécanismes cytokiniques dépendants (non spécifiques). L'ensemble de ces mécanismes de suppression est résumé dans la figure 39.

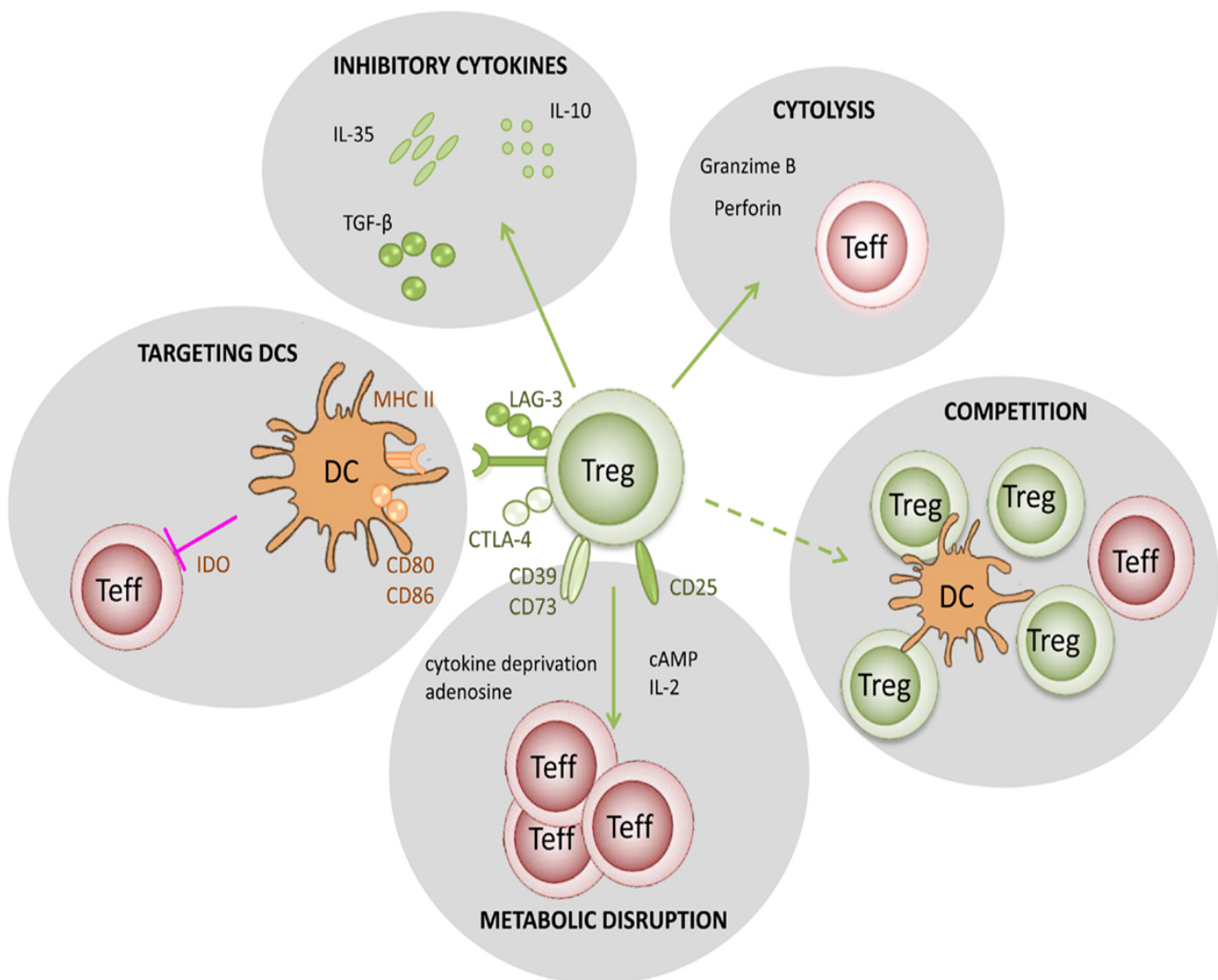


Figure 39 : Mécanismes de suppression des Treg. Les Treg inhibent la réponse immune en ciblant les DC, en sécrétant des cytokines immunosuppressives, en induisant la cytolyse, en perturbant le métabolisme des cellules et par compétition avec les lymphocytes T effecteurs. D'après Caridade, *m, frontiers in immunology*, 2013.

4- Les fonctions physiologiques et physiopathologiques des Treg

Les Treg jouent un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme par leur capacité à inhiber les cellules effectrices afin de maintenir une tolérance périphérique au soi. L'activité des Treg peut donc, selon les conditions, être physiologique ou physiopathologique. Dans des conditions physiologiques, les Treg favorisent la tolérance fœto-maternelle, la tolérance d'allogreffe, le contrôle des maladies auto-immunes et inhibe le développement des maladies inflammatoires chroniques [826, 827]. Cependant, les Treg peuvent également inhiber les réponses immunes anti-infectieuses, anti-virale et anti-tumorales, favorisant le développement de physiopathologies [828].

4.1- Treg et la tolérance fœto-maternelle

L'immunité maternelle a besoin de s'adapter pour tolérer la greffe semi-allogénique. En effet, du point de vue immunologique, l'embryon est considéré comme une greffe semi-allogénique avec des alloantigènes d'origine paternelle [827]. Différents mécanismes sont ainsi mis en œuvre pour inhiber les agressions du système immunitaire maternel contre les alloantigènes du fœtus. Le premier de ces mécanismes est la barrière physique placentaire qui constitue une interface sélective entre le fœtus et la mère [829]. En effet, cette barrière possède des molécules HLA-G qui inhibent l'activation des cellules NK. On trouve aussi les molécules de FasL exprimées par les cellules trophoblastiques et qui induisent l'apoptose des lymphocytes T maternels allo-spécifiques [829]. Cependant, ces mécanismes ne permettent pas de dépleter tous les lymphocytes allo-réactifs de la mère [827]. Ainsi, d'autres mécanismes systémiques sont mis en jeu pour altérer la réponse immunitaire maternelle. Ces mécanismes font intervenir un recrutement important des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ qui inhibent la réponse allo-réactive Th1, bloquent l'activité effectrice des cellules T maternelles et réduisent l'immunité contre les alloantigènes paternels [827]. En effet, des études montrent clairement que des souris thymectomisées puis reconstituées avec des cellules T dépourvues de Treg, et accouplées avec un mâle conduit à un développement altéré de la gestation [829]. De plus, d'autres études ont également montré que les lymphocytes T convertis en périphérie (Tr1 et Treg FOXP3⁺) pouvaient favoriser cette tolérance fœto-maternelle [659, 830, 831]. Il y a donc une forte expansion des Treg naturels et induits pendant la grossesse qui serait associée à la tolérance du fœtus [659]. Ainsi, la présence précoce d'antigènes fœto-paternels au cours de la grossesse permettrait la génération de Treg et leur relargage continu dans la circulation sanguine maternelle [832]. Cependant, la diminution du nombre des Treg ou la présence d'un défaut de leur activité conduit à l'infertilité, à des pré-éclampsies, et à des fausses couches [833].

4.2- Treg et tolérance en transplantation d'organes

En cas d'insuffisance fonctionnelle terminale d'un organe, (cirrhose sévère), la transplantation est la seule solution permettant de restaurer l'activité de l'organe. Cependant la réponse cellulaire allogénique déclenchée par le système immunitaire du receveur contre le greffon est responsable du rejet qui reste un obstacle majeur au succès de ce type de thérapie [834]. Ces rejets peuvent être aigus (quelques jours après la transplantation) ou chroniques (quelques mois après la transplantation) [835, 836]. Les rejets sont associés à des mécanismes immunitaires très importants : activation des lymphocytes T, des granulocytes et des macrophages aboutissant à la destruction de l'organe. En effet, les alloantigènes du greffon sont présentés par les CPA exprimant les molécules du CMH aux lymphocytes T CD4+ et TCD8+. L'activation de ces derniers conduit à la production importante de cytokines pro-inflammatoires, la production de quantités importantes d'anticorps et le développement des activités cytotoxiques [835-837]. Lorsque ces rejets sont partiellement maîtrisés par les Treg du receveur, on parle de tolérance opérationnelle. Cette dernière est amplifiée grâce à l'ajout d'immunosuppresseurs. Sans ajout de traitements immunosuppresseurs, l'inflammation provoquera des lésions conduisant au rejet du greffon. Les rejets sont donc principalement médiés par les réponses immunes cellulaires et humorales [837]. L'action des immunosuppresseurs contribue à augmenter la fréquence des Treg et diminuer celle des cellules T allo-réactives [838, 839]. En effet, un nombre plus élevé de Treg a été observé dans le sang et au sein du greffon de patients ayant tolérés leur greffe [840]. En transplantation hépatique (TH), des études ont montré que les patients présentant un rejet aigu ont moins de Treg que les patients sans rejet [841]. D'autres études montrent que la transplantation allogénique peut être responsable de la génération d'iTreg allo-réactifs, ou de l'expansion de Treg préexistants chez l'hôte, favorisant ainsi une meilleure tolérance de l'allogreffe [842].

4.3- Treg et maladies auto-immunes

L'importance des cellules régulatrices dans le contrôle du développement des maladies auto-immunes a été décrite [843]. En effet, la déplétion des lymphocytes régulateurs TCD4+CD25+ chez la souris conduit à un syndrome auto-immun sévère. Mais, la réinjection de ces lymphocytes permet la guérison du modèle animal [616]. Par ailleurs, une mutation du gène FOXP3 chez l'homme, conduit à une déficience des lymphocytes T régulateurs aboutissant au développement d'une maladie auto-immune lympho-proliférative appelée syndrome IPEX [844]. Ainsi, de nombreuses pathologies auto-immune humaines sont associées à un défaut de Treg : Sclérose en plaque, polyarthrite rhumatoïde, lupus, diabète de type 1, etc. [845, 846]. Les Treg seraient donc essentiels au contrôle du développement des MAI.

4.4- Treg et allergies

Les allergies sont des maladies chroniques résultant d'une hyper-sensibilité du système immunitaire. Dans certains cas, elles sont associées au développement de maladies auto-immunes [843]. De nombreuses études montrent que les Treg jouent un rôle essentiel dans le contrôle de ces allergies. En effet, des études ont montré que les patients asthmatiques présentaient un défaut de Treg CD4⁺CD25⁺ et une réponse excessive Th2 [847]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que la présence d'allergène activait la réponse Th1/ Th2 et réduisait l'activité des Treg [848]. Ainsi, les Treg peuvent inhiber la réponse T spécifique des allergènes, réduisant l'hyper-sensibilité de l'organisme [849].

4.5- Treg et immunité anti-tumorale

L'échappement immunitaire est une caractéristique majeure du cancer. En effet, les tumeurs ont développé divers mécanismes pour détourner la réponse immune anti-tumorale [850]. Ces mécanismes consistent principalement au recrutement massif de lymphocytes T régulateurs *via* la sécrétion de chimiokines en quantités importantes [851]. En effet, les tumeurs secrètent des chimiokines, comme le CCL-22, CXCL-12, CXCL-3 et CCL-17 qui sont capables de recruter les Treg au sein du microenvironnement tumoral [851-853]. Mais, le rôle de ces Treg recrutés est très ambigu dans les cancers. En effet, dans des conditions présentant une inflammation chronique qui peut initier la transformation maligne, les Treg inhibent le développement de l'inflammation responsable de la tumorigenèse et empêchent ainsi l'initiation des cancers [850]. Cependant, dans les tumeurs solides, les Treg sécrètent d'importants facteurs responsables de la réduction de la réponse immune anti-tumorale [852]. De nombreuses études chez l'homme ont mis en évidence une fréquence importante des Treg dans le sang de patients atteints de cancer mais aussi dans les ganglions drainant les masses tumorales notamment dans le CHC [854, 855]. D'autres études révèlent que l'infiltration des Treg au sein des tumeurs solides pourrait avoir une valeur pronostique. En effet, un taux plus important de Treg est associé à un mauvais pronostic [90, 618]. Les cellules tumorales produisent également de nombreux facteurs immunosuppresseurs tels que l'IL-10, le TGF- β et la cyclooxygénase-2, capables de convertir les T conventionnels en iTreg responsables de l'inhibition de la réponse immune locale [856]. Les Treg totaux vont donc, inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale en exerçant leur fonction suppressive sur les CD4⁺, les CD8⁺, les DC et les NK ce qui conduit principalement à une diminution de la production d'IFN- γ [857, 858].

4.6- Treg et immunité anti-infectieuse

Tout comme dans les cancers, le rôle des Treg est variable et controversé en cas d'infection. En effet, le Treg on un rôle protecteur en cas d'infection chronique car il évite la formation des lésions nécrotico-inflammatoires [859, 860]. Cependant, en inhibant les réponses anti-infectieuses et anti-virales, les Treg peuvent favoriser la persistance des pathogènes et donc la progression de la maladie [235]. Ainsi, la résultante de la fonction des Treg dépend du type de pathogènes infectieux (bactérie, virus, parasite, ou champignon) et du type d'infection (aiguë ou chronique) [861].

Les Treg ont un rôle protecteur en cas d'infection par certains virus comme l'HSV2 (Herpes Simplex Virus 2) et LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus) [862]. En effet, des études ont montré qu'en cas d'infection chronique par LMCV, la fréquence et l'activité élevée des Treg augmentait l'activité anti-infectieuse des lymphocytes TCD8+ favorisant ainsi l'élimination du pathogène [862]. Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'en cas d'infection murine par HSV2, la déplétion des Treg avant l'infection vaginale était associée (i) à une mortalité accélérée ; (ii) à un recrutement plus tardif des cellules effectrices sur le site de l'infection et dans les ganglions drainants ; et (iii) à une augmentation de la charge virale [863]. Dans certaines pathologies, les Treg peuvent également avoir un rôle protecteur. En effet, ils protègent le foie des lésions hépatiques dues à la réponse immunitaire inflammatoire dirigée contre le VHC (voir chapitre suivant) [864]. Les Treg sont également protecteur dans les infection à *Plasmodium sp.*, *Toxoplasma gondii* et *Candida albicans* [861]. Les Treg ont donc un rôle positif dans le contrôle de la réponse immune mais ce contrôle peut avoir des conséquences physiopathologiques.

En effet, l'augmentation de la fréquence et de l'activité des Treg inhibent les réponses immunes anti-infectieuses et donc peut favoriser la persistance du pathogène [235]. Ainsi, des études ont montré que l'infection bactérienne par *Listeria Monocytogene*, *Mycobacterium Tuberculosis* ou par *Salmonella Enterica*, associée à une augmentation de la fréquence des Treg conduisait à la progression de la pathologie [861]. Par ailleurs, certains composants pathogéniques favorisent le recrutement des Treg en stimulant la production d'importantes quantités de chimiokines [89]. En outre, les pathogènes peuvent également favoriser l'expansion des Treg, conduisant à l'installation d'un environnement tolérogène qui favorise la persistance de la maladie [235]. Dans le cas d'infection par le VHC, de nombreuses études ont également montré que le recrutement intra-hépatique massif des Treg favorisait la progression de la maladie hépatique [865].

Ainsi, en cas d'infection par certains pathogènes comme le VHC, le Treg ont un rôle protecteur car il évite la formation des lésions nécrotico-inflammatoires [859, 860]. Mais, en inhibant les réponses anti-virales et anti-infectieuse, les Treg peuvent également favoriser la persistance des pathogènes et donc la progression de la maladie [235].

F/ ROLE DES TREG DANS L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE C

1- Fréquence des Treg dans l'évolution de l'hépatite C

Chez environ 80% des patients, malgré le développement des réponses immunes innées et adaptatives, l'hépatite C aiguë devient chronique [32]. Cette chronicité est caractérisée par des réponses immunes cellulaires et humorales se développant à la fois au niveau intra-hépatique et en périphérie [411]. Les mécanismes de la persistance virale sont donc ceux de l'échec des réponses immunes à contrôler la réplication du virus et sa propagation. En effet, pour échapper à cette réponse immune, le virus de l'hépatite C va développer de nombreuses stratégies. De nombreuses études attribuent des raisons multifactorielles à la chronicité du VHC à telles que les caractéristiques virologiques (vitesse de réplication, mutation adaptatives), mais d'autres études dont les nôtres explique cette aggravation, en partie, par la présence des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui favorisent l'environnement immunosuppresseur et la progression de la maladie [610, 611].

Les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'infection chronique par le VHC. Ce rôle a été suggéré pour la première fois lorsque des études ont décrit une fréquence importante des Treg dans le foie et dans le sang de patients chroniquement infectés comparés aux sujets sains ou aux patients qui guérissait spontanément [866, 867]. Par la suite, de nombreuses autres études ont confirmés cette hypothèse en décrivant une augmentation des Treg FOXP3+ chez les patients VHC+ [868, 869]. En effet, Les lymphocytes T CD4+CD25+ représentent environ 13,5% des cellules T CD4+ périphériques dans la circulation sanguine des patients chroniquement infectés par le VHC, ce qui est très élevé par rapport au niveau de Treg chez les sujets sains : 5,3% (+/-0,8) [868]. Cependant, les niveaux d'expression de FOXP3 et la suppression médiée par les Treg au cours de la phase aiguë de l'infection, ne sont pas différents entre les patients qui éliminent spontanément le virus de ceux qui développent une chronicité, suggérant ainsi que l'expansion et l'induction des Treg surviennent au cours de la phase aiguë de l'infection [868].

2- Rôle protecteur des Treg dans l'hépatite C

Certaines études montrent que les Treg peuvent jouer un rôle protecteur dans l'hépatite C. En effet, la prolifération des lymphocytes T CD4+ spécifiques du virus est plus importante dans les PBMC de patients présentant des niveaux ALAT élevés en comparaison aux patients avec des

ALAT normaux [870]. Car, un taux très élevé de transaminases est généralement associé à la sévérité de la pathologie hépatique, caractérisé par le développement de lésions hépatiques [39]. Par ailleurs, des études ont montré que les cellules CD4⁺CD25⁺ des patients supprimaient plus efficacement l'activité des cellules T CD4⁺, suggérant ainsi que les Treg pourraient jouer un rôle favorable en contrôlant la réponse inflammatoire chronique et en inhibant les lésions hépatiques chez les porteurs chroniques du VHC [870, 871]. D'autres études ont montré que la fréquence élevée des Treg pouvait être associée à une augmentation de la réponse IFN- γ -spécifique dirigée contre la protéine virale NS3 du VHC, correspondant ainsi à la clairance virale C [872]. Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que la présence des Treg infiltrant les tumeurs était associée à des niveaux élevés de lymphocytes T effecteurs dans la circulation périphérique [865]. Ainsi, les Treg infiltrant le foie infecté seraient responsables de la limitation des dommages hépatiques tout en facilitant une réponse immunitaire anti-virale plus efficace.

3- Contribution des Treg dans la pathogénèse de l'hépatite C

Notre équipe a décrit une augmentation intra-hépatique et périphérique significative des marqueurs des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ et Tr1 chez les patients présentant une cirrhose virale C ou un CHC par rapport aux patients sans lésions hépatiques [610]. Par ailleurs, ces travaux ont montré que le recrutement intra-hépatique de cellules T régulatrices était spécifique de l'infection par le VHC, car cette augmentation de Treg n'a pas été retrouvée dans les biopsies hépatiques de patients présentant un CHC alcoolique [90]. Par ailleurs, des études plus récentes ont confirmé le rôle de l'environnement dans le développement et la fonction des Treg. En effet, ces études ont montré que les foies cirrhotiques de patients VHC⁺ sont modérément infiltrés par les Treg alors que les foies de patients VHC⁺ présentant un CHC sont très infiltrés par les Treg [873]. Par contre, les foies patients non-cirrhotiques semblent posséder d'infimes quantités de Treg exprimant peu d'OX40 mais qui produisent plus d'IFN- γ [873]. Cette dernière étude suggère que la différence d'infiltration semble contrôlée par l'expression d'OX40 par les Treg et de son ligand. Par ailleurs, l'ensemble de ces études suggère que l'infiltration des Treg pourrait favoriser l'évolution vers la chronicité de l'infection VHC, mais aussi limiter les dégâts tissulaires médiés par la réponse immunitaire [873]. D'autres travaux montrent que le VHC peut lui-même favoriser la production des Treg. En effet, ces études montrent que les hépatocytes infectés sécrètent des quantités importantes de TGF- β qui stimulent l'émergence de lymphocytes T régulateurs [874]. Par ailleurs, d'autres études ont évalué l'importance des interactions entre le VHC et les cellules hépatiques sur le développement des Treg qui favoriserait l'évolution vers la chronicité. En effet, les hépatocytes infectés par le VHC et mis en co-culture avec des cellules CD4⁺, semblent induire le

développement des Treg exprimant Gal-9 et le TGF- β . La Gal-9 en se liant à TIM-3, exprimé sur les cellules CD4+, favorise le développement des Treg et inhibe les cellules Th1 [875, 876]. En outre, d'autres études ont montré que les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ isolés du sang de patient VHC+, pouvaient supprimer les réponses TCD8+ spécifiques du VHC alors que la déplétion de la population cellulaire CD25+ améliorait la prolifération des cellules TCD8+ et TCD4+ spécifiques [866, 867]. Néanmoins, aucune étude ne permet d'affirmer si l'augmentation de la fréquence des Treg représente une réponse antigène-spécifique au VHC ou si cette augmentation est une conséquence de l'inflammation chronique et/ou de la maladie hépatique.

4- Rôle des Treg dans la persistance du VHC

Les Treg pourraient également être directement responsable de la persistance du virus. En effet diverses études ont montré que les Treg pouvaient reconnaître des épitopes spécifiques du VHC identifiés sur la région structurale (Core, F/ARFP) et sur la région non structurale (NS3, NS4 et NS5b) [872, 877, 878]. De plus, en 2008, des travaux ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, grâce à l'utilisation d'un tétramère peptidique conjugué à un fluorochrome, une reconnaissance spécifique de l'antigène du VHC par les Treg FOXP3+ isolés des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients chroniquement infectés [879]. Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'une stimulation avec des épitopes du VHC favorisait l'augmentation de la population de lymphocytes T régulateurs naturels CD4+CD25^{high}FOXP3+ spécifiques [868, 879, 880]. En outre, des études ont montré une augmentation de Treg sécréteurs d'IL-10 et de TGF- β et spécifiques du VHC après stimulation antigénique par la protéine Core du VHC [647, 878, 881, 882]. Ces études suggèrent que certains épitopes immuno-dominants du VHC peuvent induire des iTreg CD4+FOXP3+ capables de supprimer les T effecteurs [877]. De plus, d'autres études ont montré que l'augmentation de la population de Treg chez les patients chroniquement infectés résulte à la fois d'une augmentation des nTreg et des iTreg. Or, on sait que en situation physiologique, les Treg CD4+CD25+ suppriment l'auto-immunité *via* leur reconnaissance des antigènes du soi [423]. Ainsi, le fait que les Treg puissent reconnaître des épitopes du VHC suggère que le génome du VHC code pour des peptides antigéniques semblables aux antigènes du soi [883]. Néanmoins, bien que ces « auto-antigènes » du VHC puissent être reconnus par les Treg circulants dans le sang de patient infectés, des études montrent que ces antigènes sont incapables de stimuler les Treg de donneurs sains [880]. Ceci suggère donc une expansion des Treg spécifiques du VHC qui n'aurait lieu que lors du développement de l'infection chronique [878]. Par ailleurs, de nombreuses études montrent que les Treg et les T effecteurs agissent par compétition pour la reconnaissance des antigènes du VHC et ce phénomène peut favoriser la progression de la maladie [879, 882, 884].

Le foie est un environnement tolérogénique dans lequel les interactions entre les DC et les Treg, en cas d'infection virale, peut favoriser le développement de la chronicité. En effet, le VHC peut activer directement les Treg (épitopes spécifiques) ou indirectement à travers son action sur les autres cellules de l'immunité [608]. Ainsi, des études ont montré que les protéines virales (Core, NS3, NS4 et NS5) pouvaient aussi inhiber la présentation antigénique des cellules dendritiques et inhiber la réponse anti-virale [608]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que les cellules dendritiques isolées du foie étaient principalement constituées de cellules dendritiques immatures exprimant faiblement les molécules de costimulation CD40, CD80, CD83 et CD86 [885]. Les cellules dendritiques hépatiques ont donc un profil « tolérogène » et elles sécrètent des quantités minimales d'IL-1 β ou de TNF- α mais des quantités importantes d'IL-10 qui peuvent favoriser la génération des iTreg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ [886]. En effet, des études ont montré que les co-cultures des DC hépatiques de patients infectés en présence des lymphocytes T allogéniques conduisent à la génération des iTreg [527]. Par ailleurs, certaines protéines virales (E1 et E2) peuvent être reconnues par les lectines de type C exprimées à la surface des DC, inhiber la présentation antigénique et favoriser la production de facteurs tolérogènes, conduisant également au développement des Treg [887, 888].

Le rôle spécifique des Treg dans la persistance virale n'est pas encore bien décrit mais de nombreuses études ont clairement démontré une corrélation positive entre la fréquence élevée des Treg et la progression de la maladie [90, 889]. En effet, des études longitudinales ont montré que les Treg isolés de patients chroniquement infectés possédaient une activité suppressive plus importante que les Treg isolés de patients spontanément guéris [868]. Ceci suggère donc que la fréquence élevée de Treg supprime les lymphocytes T effecteurs et favorise le développement de la chronicité [868]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que la transfection des lignées T (Jurkat) avec le VHC augmentait l'expression du CTLA4 et du FOXP3, rendant ces cellules immunosuppressives pour la réponse TCD4⁺ et TCD8⁺ [890]. Le VHC pourrait aussi être directement responsable du recrutement des Treg sur le site de l'infection. En effet, des études ont montré que les foies de patients chroniquement infectés produisaient des quantités importantes de chimiokines telles que CCL-17 et CCL-22 responsables du recrutement des Treg [89].

Ainsi, la présence des cellules T régulatrices (nTreg et Tr1) dans le foie des patients chroniquement infectés par le VHC et l'augmentation de leur fréquence (intra-hépatique périphérique) durant la fibrose, la cirrhose et dans le microenvironnement tumoral, suggère le rôle important des Treg dans la progression de l'hépatite C [864]. Cependant, à ce jour, l'impact direct du virus de l'hépatite C sur le phénotype et la fonction suppressive des Treg humains n'a pas encore été élucidé.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

L'infection par le VHC est caractérisée par un risque élevé de chronicité pouvant évoluer vers la cirrhose et le développement d'un carcinome hépatocellulaire. A ce stade irréversible, le seul traitement efficace reste la transplantation d'un foie sain. Malheureusement, les patients transplantés pour cause de cirrhose C sont exposés à un risque très élevé et accéléré de réinfection du greffon par le VHC. L'hépatite C est donc une maladie virale mais aussi une maladie hépatique. A ce jour, il n'existe pas de vaccin et les nouveaux traitements antiviraux, bien qu'extrêmement efficaces sur la charge virale, ne présentent que des effets limités sur la progression de la maladie hépatique. La chronicité de l'infection par le VHC est liée à des raisons multifactorielles, telles que le génotype du virus, les caractéristiques de l'hôte ou l'altération des défenses immunitaires. En effet, de nombreuses études, dont les nôtres, ont impliquées les lymphocytes T régulateurs qu'ils soient naturels (nTreg ou Treg) ou induits (Tr1, TH3) dans la progression de la pathologie hépatique

En 2004, deux premières études ont pu mettre en évidence l'implication des Treg dans la chronicité de l'infection virale C lorsqu'ils ont décrit une fréquence importante des Treg dans le foie et dans le sang de patients chroniquement infectés comparés aux sujets sains ou aux patients qui guérissait spontanément [866, 867]. Par ailleurs, il a été montré au sein du laboratoire que les Treg naturels CD4+CD25+CD127- et les Treg induits de type 1 (Tr1) CD4+CD18+CD49b+ étaient impliqués à la fois dans la progression de la pathologie vers le CHC après la primo-infection [611], mais également dans la récurrence virale C du greffon après une transplantation hépatique [90]. L'histoire naturelle du VHC semble donc étroitement liée aux Treg qui peuvent potentiellement représenter un facteur prédictif d'aggravation des dommages au foie. On sait que les nTreg et les Tr1 sont susceptibles d'aggraver l'hépatite C en supprimant la réponse Th1 anti-virale. Cependant, ces cellules régulatrices pourraient également jouer un rôle défavorable en interagissant directement avec le virus. Néanmoins, l'impact spécifique du VHC sur ces 2 populations régulatrices n'a pas encore été élucidé à ce jour.

Dans ce contexte, l'objectif majeur de ma thèse a donc consisté à valider l'hypothèse, selon laquelle le VHC pourrait directement dialoguer avec les lymphocytes T régulateurs naturels (CD4+CD25+CD127-), afin d'aggraver l'environnement immunosuppresseur et ainsi contribuer à l'échappement du virus à la réponse immune. Afin de répondre à cette hypothèse, mon premier objectif a été d'évaluer si les nTreg possédaient les récepteurs d'entrée du VHC et s'ils pouvaient internaliser le virus. Le deuxième objectif a consisté à évaluer l'impact du VHC sur le phénotype, l'état d'anergie et la fonction suppressive des nTreg. Quant au 3ème objectif, il visait à analyser le recrutement des Treg par des cellules hépatiques primaires infectées par le VHC. Et enfin, dans un

deuxième temps, j'ai souhaité analyser le rôle de l'infection virale C sur l'émergence de nouveaux lymphocytes T régulateurs induits, dans le but de potentialiser l'environnement immunosuppresseur et donc de favoriser la progression de la pathologie.

Par ailleurs, même si le principal enjeu de ma thèse a été d'évaluer l'impact direct du VHC sur les lymphocytes T régulateurs humain, une partie annexe de mes travaux visait également à mettre en évidence le recrutement intra-hépatique des cellules Tr1 dans les biopsies d'un patient chroniquement infecté par le VHC et ayant évolué sur 18 ans de la chronicité vers le carcinome hépatocellulaire.

RESULTATS

Chers membres du Jury, Chers lecteurs,

Ce chapitre résultat a été divisé en trois grandes parties qui sont présentées sous forme d'articles scientifiques. Les articles 1, 2 et représentent les principaux travaux de ma thèse. Ainsi vous pourrez distinguer :

Article 1 : Surexpression des marqueurs spécifiques des lymphocytes T régulateurs induits de type 1 (Tr1) chez un patient ayant développé un carcinome hépatocellulaire consécutif à une cirrhose virale C. **Laurissa Ouaguia**, Olivier Moralès, Dhafer Mrizak, Khaldoun Ghazal, Emmanuel Boleslawski, Claude Auriault, Véronique Pancré, Yvan de Launoit, Filoména Conti et Nadira Delhem, *ISRN Hepatology Volume 2013 (2013), Article ID 928485, 7 pages.*

Article 2 : Le virus de l'hépatite C (VHC) contribue à l'aggravation de l'environnement immunosuppresseur en augmentant le phénotype et l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs naturels humains (nTreg ou Treg) et en favorisant leur recrutement vers le foie. **Laurissa Ouaguia**, Olivier Moralès, Lynda Aoudjehane, Czeslaw Wychowski, Arnaud Carpentier, Jean Dubuisson, Yvan de Launoit, Yvon Calmus, Filomena Conti, Nadira Delhem. *En soumission*

Article 3 : L'inoculation des cellules T conventionnelles avec le VHC favorise l'émergence des lymphocytes T régulateurs induits. **Laurissa Ouaguia**, Olivier Moralès, Czeslaw Wychowski, Samah Sfaxi, Manon Devreese, Jean Dubuisson, Yvon Calmus, Filomena Conti, Nadira Delhem. *En préparation*

Les autres articles et revues relatant les principaux travaux auxquels j'ai contribué au cours de ma thèse seront présentés en annexes.

ARTICLE 1

Etude de Cas : Surexpression des marqueurs spécifiques des lymphocytes T régulateurs induits de type 1 (Tr1) chez un patient porteur d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) consécutif à une cirrhose virale C.

A Case Report: Overexpression of Regulatory T-Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma

ISRN Hepatology Volume 2013 (2013), Article ID 928485, 7 pages

Laurissa Ouaguia, Olivier Moralès, Dhafer Mrizak, Khaldoun Ghazal, Emmanuel Boleslawski, Claude Auriault, Véronique Pancré, Yvan de Launoit, Filoména Conti et Nadira Delhem.

Mots clés : Tr1, CD18, CD49b, IL-10 et TFG- β 1

Résumé : Le virus de l'hépatite C (VHC) est un agent causal important dans le développement des pathologies hépatiques. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance des réponses vigoureuses et multi spécifiques médiées par les lymphocytes TCD4+ et TCD8+ dans la résolution de l'infection aiguë par le VHC. Même si, le développement de la chronicité a été associés à la présence des cellules anti-inflammatoires de type Th2, les autres facteurs associés à la progression de l'infection virale C restent encore mal compris. En effet, cette progression peut également être due à l'installation d'un micro-environnement immunosuppresseur qui inhibe les réponses anti-virales T spécifiques. Ainsi, la présence des cellules immunosuppressives Tr1, sécrétrices d'IL-10, pourrait expliquer l'inhibition de la réponse immunitaire. Des études préliminaires, réalisées dans l'équipe, ont mis en évidence une augmentation de la fréquence des Tr1 dans les biopsies de trois cohortes indépendantes de patients VHC+ ayant développés différents stades de l'hépatite C jusqu'au carcinome hépatocellulaire. Ces résultats suggéraient que les Tr1 étaient associés à la pathogenèse virale. Dans cette étude de cas, nous suggérons que l'existence des mécanismes immunosuppresseurs, contrôlés par les Treg en général et par les Tr1 en particulier, pourrait expliquer l'échappement à la réponse immune au cours de l'infection virale C et ainsi, favoriser la progression de la maladie vers la fibrose et vers le carcinome hépatocellulaire (CHC).

Matériels et Méthodes : Trois biopsies hépatiques ont été récupérées sur un patient chroniquement infecté par le VHC, de génotype 1b, pour une étude rétrospective longitudinale. La première biopsie à été effectuée en 1980, pendant la phase chronique de l'infection sur un foie ne présentant aucune lésion hépatique. La seconde biopsie, prélevée en mars 1990, a montré une évolution de la maladie et la présence de nodules cirrhotiques au foie. Enfin, la troisième biopsie, réalisée en 1998, a montré une maladie hépatique très avancée avec un foie présentant un carcinome hépatocellulaire. Ces trois biopsies ont été utilisées pour analyser l'évolution de la fréquence des Tr1 au cours de la progression de la maladie. Cette étude transcriptomique a permis d'analyser les réponses T intra-hépatiques en terme de cytokines, de récepteurs aux cytokines et de molécules d'adhésion chez un patient développant une hépatite C persistante bien que sous traitement à base d'interferon alpha et de Ribavirine (INF- α /RBV).

Des biopsies d'environ 1cm de longueur et 1.6 mm de diamètre ont été faites (procédure standard Menghini). Ces biopsies ont été effectuées dans le cadre du suivi médical du patient sur une période de 18 ans allant de l'infection chronique jusqu'au CHC. Sur la base du score nécrotico-inflammatoires (NI) et sur la base des scores histologiques de fibrose, ces biopsies ont été réparties en 3 catégories : une biopsie avec une hépatite chronique minime sans lésions histologiques du foie (B1), une biopsie avec un grade avancé de fibrose, des lésions hépatiques et la présence d'une cirrhose du foie (B2). Et enfin une biopsie présentant un carcinome hépatocellulaire (B3). La

présence ou l'absence de ces modifications histologiques a été confirmée par des anatomopathologistes. Les biopsies récupérées ont été congelées et conservées pour des études ultérieures d'extraction d'ARN. L'extraction des ARN totaux des biopsies congelées a été effectuée en utilisant la technique du TRizol. Chaque biopsie a été lysée dans le TRizol puis la solution a été déprotéinée par une extraction au chloroforme. Ensuite, les ARN totaux ont été immuno-précipités par ajout d'isopropanol avant d'être lavés puis traités à la DNase. Ces ADN complémentaires ont ensuite été synthétisés à partir d'une concentration de 100ng/uL des ARN et la quantification des transcrits a été effectuée par RT-Q-PCR sur 21 gènes d'intérêt normalisés par 2 gènes de ménage (G3PDH et β -actine). L'amplification des ADNc a été répétée 3 fois à partir des ARN totaux du même échantillon. Après chaque RT-Q-PCR, la présence des amplicons et la spécificité des primers a été indépendamment évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% TBE.

Résultats et Discussion: Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression quantitative des marqueurs des différentes populations immunitaires du foie par RT-Q-PCR (figure1), résultats que nous avons ensuite validés par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 2). Nous avons observé une augmentation de l'expression du marqueur CD19 dans les biopsies cirrhotiques (B2) et dans les biopsies CHC (B3) comparés aux échantillons B1. Ces résultats sont parfaitement en corrélation avec les données de la littérature qui montrent une activation des lymphocytes B en cas d'infection chronique par le VHC. Nos résultats montrent également une surexpression génique du CD8 β mais pas celle du CD8 α dans les échantillons B2 et B3. Ces résultats ont également conformes avec la littérature qui fait mention d'une augmentation de l'infiltrat CD8 β dans le foie des patients VHC+. Par ailleurs, l'observation majeure que nous avons effectuée est une augmentation significative et progressive de l'expression du CD4 avec l'aggravation de la maladie. Néanmoins, nous n'avons observé aucune modification de l'expression de l'IFN- γ , ni celle de l'IL-2, ni même celle de l'IL-4, suggérant ainsi que les lymphocytes TCD4+ détectés dans les biopsies B2 et B2 ne sont probablement pas des cellules Th1 ni Th2. De plus, l'augmentation progressive de l'expression des marqueurs CD4, CD25 et ICAM1 (de B1 vers B3) suggère qu'une partie importante de l'infiltrat hépatique des CD4+ est constituée de lymphocytes T régulateurs naturels CD4+CD25+. Ces résultats confirment d'ailleurs des résultats antérieurs obtenus au laboratoire qui ont décrit un recrutement important des lymphocytes T régulateurs naturels au cours de la progression de l'hépatite C [611]. De manière très intéressante, nous avons également montré une surexpression des marqueurs spécifiques de la sous-population de lymphocytes T régulateurs induits de type 1 (Tr1). En effet, nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression des marqueurs phénotypiques CD18, CD49b et une augmentation significative des marqueurs fonctionnels IL-10 et TGF- β 1. De plus, l'augmentation

intra-hépatique de l'expression des récepteurs spécifiques à l'IL-10 (IL-10R α et IL-10R β) et au TGF- β 1 (TGF- β R1 et TGF- β R2) suggère l'existence d'une biodisponibilité à ces cytokines plus importante dans le foie cirrhotique (B2) et tumoral (B3) comparés au foie sans lésions hépatiques (B1). Bien que d'autres cellules immunitaires puissent également sécréter ces cytokines immunosuppressives, l'absence de modification de l'expression des marqueurs CD11c (cellules dendritiques) tend à confirmer une production d'IL-10 principalement d'origine Tr1. Par ailleurs, l'augmentation d'IL-10 et de TGF- β 1 associée à une diminution d'IFN- γ semblent indiquer une altération fonctionnelle des lymphocytes TCD4+ spécifiques et l'installation d'un environnement immunosuppresseur qui pourrait contribuer à la persistance du virus. En outre, l'augmentation de l'expression du TGF- β 1, même modérée, pourrait accentuer le développement de la fibrose contribuant ainsi à l'aggravation de la maladie hépatique. Nos résultats montrent également une augmentation des marqueurs d'activation CD25, T1-ST2, CCR-5 et P-selectine suggérant la présence des autres familles de cellules régulatrices tels que les Treg naturels (CD4+CD25+ICAM I+) ou les Th3 (CD4+TGF- β +). Enfin, notre étude montre que ces augmentations d'expression sont proportionnelles à l'évolution de l'histoire naturelle de la maladie.

L'ensemble de nos résultats suggère que les lymphocytes T helper et les lymphocytes T régulateurs sont probablement induit contre les même épitope du génome viral et qu'un changement radical de l'infiltrat lymphocytaire devenant plus immunosuppresseur, favoriserait la progression de la maladie. Ainsi, l'induction spécifique des Tr1 pourrait favoriser l'inhibition des réponses anti-virales (Th1 et CTL) *in vivo*, contribuant à expliquer la persistance et le développement de la cirrhose.

Nous sommes parfaitement conscients de la limite de cette étude. Malheureusement, malgré le recueil de ces biopsies précieuses, leur petite taille (1.6 mm de diamètre), ne nous a pas permis de réaliser des analyses en immuno-histochimie. Ainsi, la recherche de la présence des réponses T intra-hépatiques n'a pu être réalisée que sur la base d'une analyse par RT-Q-PCR.

Conclusion : L'augmentation progressive de la fréquence intra-hépatique des lymphocytes T régulateurs naturels et induits dans le foie de ce patient, au décours de la maladie, suggère un rôle clé des Treg dans la progression de la pathologie hépatique. Par ailleurs, le recrutement de ces Treg pourrait représenter un facteur prédictif de l'aggravation des dommages au foie. Ainsi, l'augmentation de la fréquence des cellules Tr1 qui inhibent la réponse anti-virale Th1 grâce à leur production importante d'IL-10, pourrait expliquer la persistance virale et la progression de la maladie.

Case Report: Overexpression of Regulatory T-Cells Type 1 (Tr1) specific markers in a patient with HCV-induced Hepatocellular Carcinoma

Laurissa Ouaguia^{1*}, Olivier Morales^{1*}, Dhafer Mrizak¹, Magalie Sénéchal¹, Khaldoun Ghazal², Emmanuel Boleslawski^{1,3}, Yvan de Launoit¹, Filoména Conti^{2,4*} and Nadira Delhem^{1*}.

* Equally contributing authors

¹ CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex, France.

² UPMC Université Paris 6, Inserm, UMR_S938, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris, France

³ Service de Chirurgie Digestive et Transplantations, Hôpital Huriez, CHU, Univ Nord-de-France F-59000, Lille, France

⁴ Centre de Transplantation Hépatique, Pôle Digestif, APHP, Hôpital Saint Antoine, 184 rue de Faubourg Saint Antoine, 75012 Paris, France

Running title: Tr1 and HCV-induced Liver Carcinoma

Key Words : Tr1, CD18, CD49b, IL-10, TGFβ1

Corresponding Author:

Dr Nadira Delhem : Institut de biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex, france

Tel : + 33 3 20 87 12 53, Fax : + 33 3 20 87 10 19, Email: nadira.delhem@ibl.fr

Supporting information: This work received support from the “Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les Hépatites (ANRS). This work was supported by SIRIC ONCOLille.

Disclosure: The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is an important causative agent of liver disease, but factors that determine the resolution or progression of infection are poorly understood. In this study, we suggested that existence of immunosuppressive mechanisms, supporting by regulatory T cells and especially the regulatory T-cell 1 subset (Tr1), may explain the impaired immune response during infection and thus the fibrosis aggravation to hepato-cellular carcinoma (HCC). Using quantitative real time PCR, we investigated the intra-hepatic presence of Tr1 cells in biopsies from a genotype 1b-infected patient followed for a 18 year period from cirrhosis to HCC. We described a significant increase of gene expression in particular for the cytokines IL-10, TGF β , and their receptors that were perfectly correlated with an increased expression of the Tr1 specific markers (combined expression of CD4, CD18 and CD49b). This was strongly marked since the patient evolved in the pathology and could explain the failure of the treatment. In conclusion, evidence of regulatory T cell installation in the liver of chronically infected patient with cirrhosis and HCC suggest for the first time a key role for these cells in the course of HCV infection.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a parentally transmitted hepatotropic RNA virus that causes chronic hepatitis, which may lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (Alter *et al*, 1992). Evidence suggests that clearance and control of HCV infection during acute phase is dependent on vigorous and multispecific CD4 and CD8 T lymphocyte responses (Chang *et al*, 2001, Rehermann *et al*, 2000). On the contrary, the development and maintenance of chronic infection is linked to weak or absence of HCV-specific Th1 response and to the presence of Th2 cytokines (IL-4 and IL-10)(Tsai *et al*, 1997, Kakumu *et al*, 1997). So, some studies have implicated IL-10 in HCV pathogenesis (Tsai *et al*, 1997, Tsai *et al*, 2000). Regulatory T-cell 1 (Tr1) were first described in 1996 (H. Groux *et al*, 1996; Groux *et al*, 1997) as a further subtype of CD4 T cells, without specific markers but with cytokine profile distinct from Th1 or Th2 cells. Indeed, they were showed as secreting high level of IL-10, moderate levels of IFN- γ and IL-5, quiet undetectable IL4 and low amounts of transforming growth factor (TGF- β). Recent studies have suggested that Tr1 could be induced against bacterial, viral and parasite antigens *in vivo* and might prevent infection-induced immunopathology or prolong pathogen persistence by suppressing protective Th1 response (McGurk *et al*, 2002, Xu *et al*, 2001), but have never been directly implicated in hepatitis C viral pathogenesis. The dysfunction of the immune response against HCV could be explained by immunosuppressive mechanisms supported by Tr1 via their high production of IL-10. The recent identification of combined expression of CD4, CD18 (Integrin α 2) and CD49b (Integrin β 2) as specific markers for Tr1 cells should facilitate their characterization *in vivo* (Rahmoun *et al*, 2006). An increased frequency of Tregs was recently described in the blood of patients with persistent HCV infection when compared with those who had cleared HCV (Cabrera

et al, 2004, Rushbrook et al, 2005). It has been proposed that Tregs contribute to HCV persistence by suppressing HCV-specific T-cell responses (Boettler et al, 2005, Manigold et al, 2007). Some studies have shown a correlation between a reduced HCV-specific T-cell response and the secretion of IL-10 and TGF- β by liver-infiltrating Tregs (Cabrera et al, 2004) and that Tregs may inhibit HCV specific T-cell activity in a cell-cell contact manner (Cabrera et al, 2004, Rushbrook et al, 2005). It has also been shown that Treg levels are significantly enhanced in recurrent hepatitis C, and that Treg type1 cell (Tr1) levels are specifically higher in severe recurrent hepatitis C (Carpentier et al, 2009). These findings suggest that Tregs may be implicated in the pathogenesis of HCV recurrence.

Moreover, the opportunity of study three histologically well-defined liver biopsies of an HCV-genotype 1b infected patient followed from the chronic infection to the HCC, allowed us to search Tr1 cells directly in the liver. The first biopsy was performed during the chronic phase (date not specified in the file) and appeared normal without any liver injury, the second one was performed during the cirrhotic phase (March 1990), and the third one during HCC (1998). Thus, we examined the intrahepatic T cell response in term of cytokines, cytokine receptors and adhesion molecules in a patient under IFN α /Ribavirine treatment and who remained persistently infected >18 years.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chronically HCV infected Patient.

The HCV infected patient was followed up in the hepato-gastroenterology department of the Necker University Hospital. Informations concerning the patient were age ALAT >three times the normal and negative anti-HAV, HBc and HEV IgM, positive serology for HCV (third generation microparticule EIA [Abbott AxSYM, Abbott Park] confirmed by RIBA strip immunoblot assay (Chiron Corporation, Emeryville, Calif). The patient was chronically infected by HCV genotype 1b. Genotyping of HCV was done using a multiplex PCR method with genotype-specific primers (17), and the concentration of HCV RNA was determined by RT-PCR with the Cobas Amplicor HCV monitor test (Roche Diagnostics, Branchburg, N.J). Patient present no human immunodeficiency virus (HIV) coinfection, immunosuppressive therapy, chronic liver disease due to hepatitis B virus, autoimmune hepatitis, or primary biliary cirrhosis and other causes of chronic liver disease.

Liver biopsy samples.

Three liver biopsies were performed for one patient who underwent several biopsies for a longitudinal study. The three biopsies were performed as part of the routine medical follow-up and were obtained by the standard Menghini procedure (needle diameter, 1.6 mm) with a biopsy sample length of approximately 1 cm. Based on histologic fibrosis (F) and necroinflammatory (NI) scores, liver biopsies were divided in : biopsies with small hepatitis and without liver lesion (F \leq 1/6, N \leq 1/18), biopsies with fibrosis grade and liver lesions corresponding to histologically proved cirrhosis (F=6/6) and biopsies with HCC histologically proved by anatomo-pathologic expertise. All biopsies were snap frozen for subsequent RNA extraction.

The study was approved by the Institut de Biologie de Lille (CNRS) Institutional Review Boards, and informed consent was obtained in writing for the donor.

RNA extraction.

Extraction of total RNA from frozen liver biopsy samples was performed using TRIzol™ reagent (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland UK) as described by the manufacturer. Tissue samples were homogenized in 300µl of TRIzol. Homogenized samples were incubated for 5 minutes at room temperature and resuspended in 60µl of chloroform (PROLABO, Merck eurolab, France). Total RNA was then immunoprecipitate with 100 µl of isopropanol (ACROS Organics, USA). The RNA pellet was finally washed twice with 75% ethanol (CARLO ERBA Reagent, France) and dissolved in DNase, Rnase-free distilled water (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland UK). Before reverse transcription, we performed DNase treatment using the kit Message clean (GenHunter corp, France)

Light Cycler-based PCR assay.

cDNA was synthesized from total RNA at a concentration of 100ng/µl using randoms hexamers and Superscript reverse transcriptase (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland UK). The quantification of transcripts from liver samples was performed by real-time quantitative RT-PCR using the Light Cycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The PCR mixture contained the following: *Taq* polymerase, 1X of LightCycler-DNA master SYBRGreen I (Roche Diagnostics, Meylan France), 3mM of MgCl₂, 0.5 µmol/L of each primer and 1 µl of cDNA preparation (patient cDNA samples) in a total volume of 20 µl. Thirty-two samples were run in parallel by performing an initial denaturation at 95°C for 8 minutes, the PCR reactions were

cycled 35 to 40 times as follows: 15 seconds at 95°C, 7 seconds at the appropriate annealing temperature (Table 1), and 18 to 64 seconds at 72°C according to the length of the target sequence. annealing (40s at 58° C). Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. The melting curve analysis was carried out immediately after amplification, following the manufacturer's instructions. Amplification of liver cDNA was successfully repeated three times with cDNA from the same extraction.

Primers.

All primers were design for real-time PCR use and were purchased from MWG-Biotech (Germany): cf Table 1. Housekeeping genes β -actin and G3PDH were used as control. Samples are quantified using relative standard curves for each amplification reaction, and results were normalized to the internal controls β -actin and G3PDH.

Gel electrophoresis.

After each Light Cycler run, agarose gel electrophoresis with TBE (Tris-Borate-EDTA)-1.5% agarose (SIGMA-ALDRICH, Germany) gel, followed by DNA staining with ethidium bromide, was performed to have an independent validation check of the presence of an amplicon. In order to control the length of the amplicon generated, a 100-bp DNA ladder (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland UK) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we first analyzed the quantitative expression of the different intra-hepatic cell populations by real-time PCR using Light Cycler system and we performed after each RT-PCR, an agarose gel electrophoresis to have an independent validation check. We observed a significant increase of CD19 expression in cirrhotic and HCC liver biopsies in comparison with the first biopsy without liver lesions (figure 1). This observation confirmed data of the literature showing disturbances of B lymphocyte activation and function associated with HCV chronic infection (Ni J et al, 2003, Curry et al, 2003). The CD8 β but not CD8 α gene expression was also increased in the cirrhotic and HCC biopsies. This observation was in correlation with recent data evidencing by a similar approach of real-time quantitative assays a significant increase and infiltration of CD8 β during chronic HCV infection (Leroy V et al, 2003). But the major observation of our work was the significant increase of CD4 expression in the course of time and proportionally with the severity of the fibrosis. However, we did not observe a variation of IFN γ or IL-2 expression, suggesting that the CD4 marker detected in cirrhosis and HCC liver biopsies were probably not associated to the Th1 protective phenotype. Due to the absence of IL-4 expression, the CD4 cells with Th2 phenotype were also excluded in accordance with the work of Bergamini A et al (2001). A further subtype of CD4 T cells with immunosuppressive function and cytokine profiles distinct from either Th1 or Th2 T cells, termed regulatory T cells has been described. They include Tr1 cells which secrete high level of IL-10 and low to moderate levels of TGF- β , Th3 cells which primarily secrete TGF- β , and CD4⁺CD25⁺ cells, which inhibit immune response through cell-cell contact (McGuirk P et al, 2002). Although the level of IL-10 and TGF- β produced in vitro may not be significantly higher than those produced by classical

Th2 cells, what is important is that Tr1 cells make these cytokines in the absence of significant levels IL-4 (Groux H et al, 1997). We confirmed within cirrhotic and HCC biopsies a significant increase of expression for IL-10, TGF β 1 and their respective receptors IL-10R α , IL-10R β and TGF β RII whereas we did not detect an increase of IL-4. So, the production of IL-10 and TGF- β in the absence IL-4 of argued in favor of the presence of Tr1 in the cirrhotic and HCC biopsies. Although, liver dendritic cells also secrete high levels of IL-10, in the present study we could not detect CD11c expression, confirming a Tr1 cells origin for IL-10 production. In this sense, functional alteration of HCV-specific CD4⁺ T cells or failure to develop a long-lasting T helper response was recently correlated to a loss of IFN- γ secretion and the presence of a significant antigen-specific IL-10 and TGF- β , which could contribute to chronic hepatitis C persistence (Ulsenheimer et al, 2003). Moreover results obtained for Tr1 specific markers CD49b and CD18 confirmed the Tr1 phenotype and showed that Tr1 cells increased during the progression of the pathology. Despite their low proliferative capacity, cloned Tr1 express normal levels of T cell activation markers such as CD25 following TCR-mediated activation. They also expressed CCR5 and T1/ST2, an IL-1-R-like molecule, markers previously expressed preferentially on Th1 and Th2 cells respectively (McGuirk 2002). We clearly confirmed here within cirrhotic and HCC biopsies the expression of CD25, CCR5 and T1-ST2 in relation with the presence of Tr1 cells. In accordance with this Tr1 phenotype, the expression of TGF β -RII was also observed. However, we can not exclude the implication of other regulatory T cell subsets, insofar as we observed a significant increase of CD25, pSelectin and ICAM I expression, which were known as specific markers for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. These observations were also conformed by others experiments we performed on liver biopsies of three well-defined cohorts of 45 HCV-

genotype 1b infected patients, including patients without liver lesions, patients with cirrhosis and patients with histologically proved HCC that confirmed an increase of Tr1 proportionally to the aggravation of the pathology (Delhem *et al*, *submitted*, 2004). A first implication of regulatory T cells during HCV infection was examined in peripheral blood of patients infected with HCV genotype 1b, showing a secretion of IFN- γ or IL-10 but not IL-4 by HCV core-specific CD4 T cell clones (Macdonald *et al*, 2002). This work demonstrated that that helper type 1 and regulatory T cells were induced probably against the same epitopes on the core protein. Very recently, Sugimoto K *et al* (2003) have suggested for the first time that HCV persistence was associated with a reversible CD4-mediated suppression of HCV-specific CD8 T cells and with higher frequency of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that could directly suppress HCV-specific type-1 CD8 T cells *ex-vivo*. Indeed, it is possible that the induction of regulatory T cells during HCV infection may suppress antiviral Th1 and consequently CD8 CTL responses *in vivo*, and this may explain the persistence of infection and prevalence of cirrhosis.

Evidence of regulatory T cells installation in the liver of a chronically infected patient with cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) suggest a key role for these cells in the aggravation of the liver pathology and could potentially represent a predictive factor of liver damage aggravation. As previously described (Kuzushita *et al*, 1997) high serum IL-10 levels may related a poor response to IFN treatment in patients with chronic hepatitis C. In our study, increase of Tr1 cells, which suppressed protective Th1 responses via their high production of IL-10, could explain the failure of the IFN treatment observed for this patient. In a more general way, the implication of Tr1 in viral persistence and associated hepatic pathologies could have significant implications for our understanding of the role of T cells in immunity to infectious

diseases and for the development of new therapies for the control of immune-mediated disorders.

Acknowledgments

We thank: Jean-Luc Lagneau of Necker Hospital for the selection of liver biopsies of HCV infected-patient, Violaine François and Arnaud Carpentier for their technical assistance.

REFERENCES

Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med.* 1992;31:1899-905.

Bergamini A, Bolacchi F, Cerasari G, Carvelli C, Faggioli E, Cepparulo M, Demin F, Uccella I, Bongiovanni B, Niutta P, Capozzi M, Lupi M, Piscitelli E, Rocchi G, Angelico M. Lack of evidence for the Th2 predominance in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol.* 2001;123:451-8.

Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 12: 7860-7

Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 5: 1062-71

Carpentier A, Conti F, Stenard F, et al. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9: 2102-12

Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loudis J et al. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;33:267-76.

Curry MP, Golden-Mason L, Doherty DG, Deignan T, Norris S, Duffy M, Nolan N et al. Expansion of innate CD5(pos) B cells expressing high levels of CD81 in hepatitis C virus infected liver. *J Hepatol* 2003;38:642-50.

Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1996;184:19–29.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-42.

Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Iwata K, Yano M, Yoshioka K. Production of interleukins 10 and 12 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1997;108:138-43.

Kuzushita N, Hayashi N, Katayama K, Kanto T, Oshita M, Hagiwara H, Kasahara A, et al. High levels of serum interleukin-10 are associated with a poor response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:169-74.

Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, Marche PN, Jouvin-Marche E. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:829-41.

MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M et al. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 2002;185:720-7.

Manigold T and Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007; 12: 804-13

McGuirk P, McCann C, Mills KH. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 2002;195:221-31.

Ni J, Hembrador E, Di Bisceglie AM, Jacobson IM, Talal AH, Butera D, Rice CM, Chambers TJ et al. Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J Immunol* 2003, Mar 15;170:3429-39.

Rahmoun M, Foussat A, Groux H, Pène J, Yssel H, Chanez P Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;140(2):139-49. Epub 2006 Apr 4

Rehermann B, and FV Chisari. Cell mediated immune response to the hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2000;242:299-325.

Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 12: 7852-9

Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003; 38:1437-48.

Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997;25:449-58.

Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;37:1189-98.

Widell A, Shev S, Mansson S, Zhang YY, Foberg U, Norkrans G, Fryden A, Weiland O, Kurkus J, Nordenfelt E. Genotyping of hepatitis C virus isolates by a modified polymerase chain reaction assay using type specific primers: epidemiological applications. *J. Med. Virol.* 1994;44:272-9.

Woitars RP, Perterson U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbrych t, Sprengler U. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* 2002;3:562-6.

Xu X, Sumita K, Feng C, Xiong X, Shen H, Maruyama S, Kanoh M, Asano Y. Down-regulation of IL-12 p40 gene in *Plasmodium berghei*-infected mice. *J Immunol* 2001;167:235-41.

LEGENDS

Table 1: Primer sequences used in Real-time Quantitative RT-PCR Assay

Figure 1: Light cycler-based PCR assay analysis

Histogram analysis of liver biopsies from the same genotype 1b-infected patient for expression of various immune markers. Amplification of liver cDNA was successfully repeated three times with cDNA from the same extraction (B1= healthy biopsy; B2= cirrhotic biopsy; B3= HCC biopsy). The prevalence of gene expression was calculated by comparing the cycle numbers (CT) of the logarithmic linear phase of the samples 2 and 3 with the cycle numbers of sample 1, which was designed as reference (Δ CT),

Samples are quantified using relative standard curves for each amplification reaction and results were normalized to the internal controls β -actin and G3PDH.

Figure 2: Agarose gel electrophoresis analysis

Agarose gel electrophoresis analysis showed amplification of cDNA extracted from liver biopsies, by the Light CyclerTM technique for T regulatory markers and immunoregulatory associated factors.

TABLE AND FIGURES

Table 1: Primer Sequences Used in Real-Time Quantitative RT-PCR Assay

Gene	Primers Sequences	Annealing Temperature (°C)	Gene	Primers Sequences	Annealing Temperature (°C)
hCD4:	5'-GGGAAATCAGGGCTCCTTCTTA 5'-TGGTCCCAAAGGCTTCTTCTT	59	hIL-4:	5'- CACAAGCAGCTGATCCGATTC 5'-TTCCAAGAAGTTTTCCAACGTA	59
hCD25:	5'-GGGACTGCTCACGTTTCATCA 5'-TTCAACATGGTTCCTTCTTGTAG	59	hIL-2:	5'-ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTAC 5'-TCCAGAGGTTTGAGTCTTCTTCTAGA	61
hCD49b:	5'-CAACGGGTGTGTGTTCTGACA 5'-TCATCACACACAACCAACATCT	59	hIL-10:	5'-GAGAACCAAGACCCAGACATCAA 5'-CCACGGCCTTGCTCTTGTT	59
hCD18:	5'-ATGCTTGATGACCTCAGGAATGT 5'-ACGGTCTTGTCCACGAAGGA	59	hIL-10R α :	5'-CCGAGAGTATGAGATTGCCATTC 5'-CAGATGGTTTCACCTGGACACA	60
hT1-ST2:	5'-GTGTTTGCCTCAGGCCAACT 5'-TGACATTCCGATATCCAGTCCTA	59	hIL-10R β :	5'-TGGGAGTCACCTGCTTTTGC 5'-TCCGTCAAGGTAGTATTCATGCA	59
hCCR5:	5'-GTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATT 5'-CGGGCTGCGATTGCTT	57	hIFN γ :	5'-ATGTAGCGGATAATGGAAGTC 5'-GACATTCAAGTCAGTTACC	53
hCD8 α :	5'-CCCTGAGCAACTCCATCATGTAC 5'-GGCGTCGTGGTGGGC	60	hTGF- β 1:	5'-CGAGCCTGAGGCCGACTAC 5'-CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA	62
hCD8 β :	5'-TGGCCGCGCAGCTG 5'-CTTGTTGGTTTGCACCTTTATGTATG	55	hTGF- β 1R1:	5'-TGACAACGTCAGGTTCTGGCT 5'-AATCGACCTTTGCCAATGCT	57
hCD19:	5'-CTCACCCCATGGAAGTCAG 5'-CTTGAGGCACTGCAGCACAG	60	hTGF- β 2:	5'-GCTGCTTCTCAAAGTCATT 5'-AACAAAGTCAGGATTGCTGGTGT	58
hCD11c:	5'-AATTCAGGCGCAGTCAA 5'-ATCCCTACGGGCCCATAT	56	hP-Selectin:	5'-CTGGAACCCCTGAGTCTACCAC 5'-GTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATC	63
hICAM-1:	5'-CCCTGATGGGCAGTCAACA 5'-GCAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG	60			
h β -actin:	5'-CACGGCATCGTCACCAACT 5'-AGCCACACGCAGCTCATTG	58	h5'G3PDH:	5'-CCATCAATGACCCCTTCATTG 5'-CTTGACGGTGCCATGGAATT	58

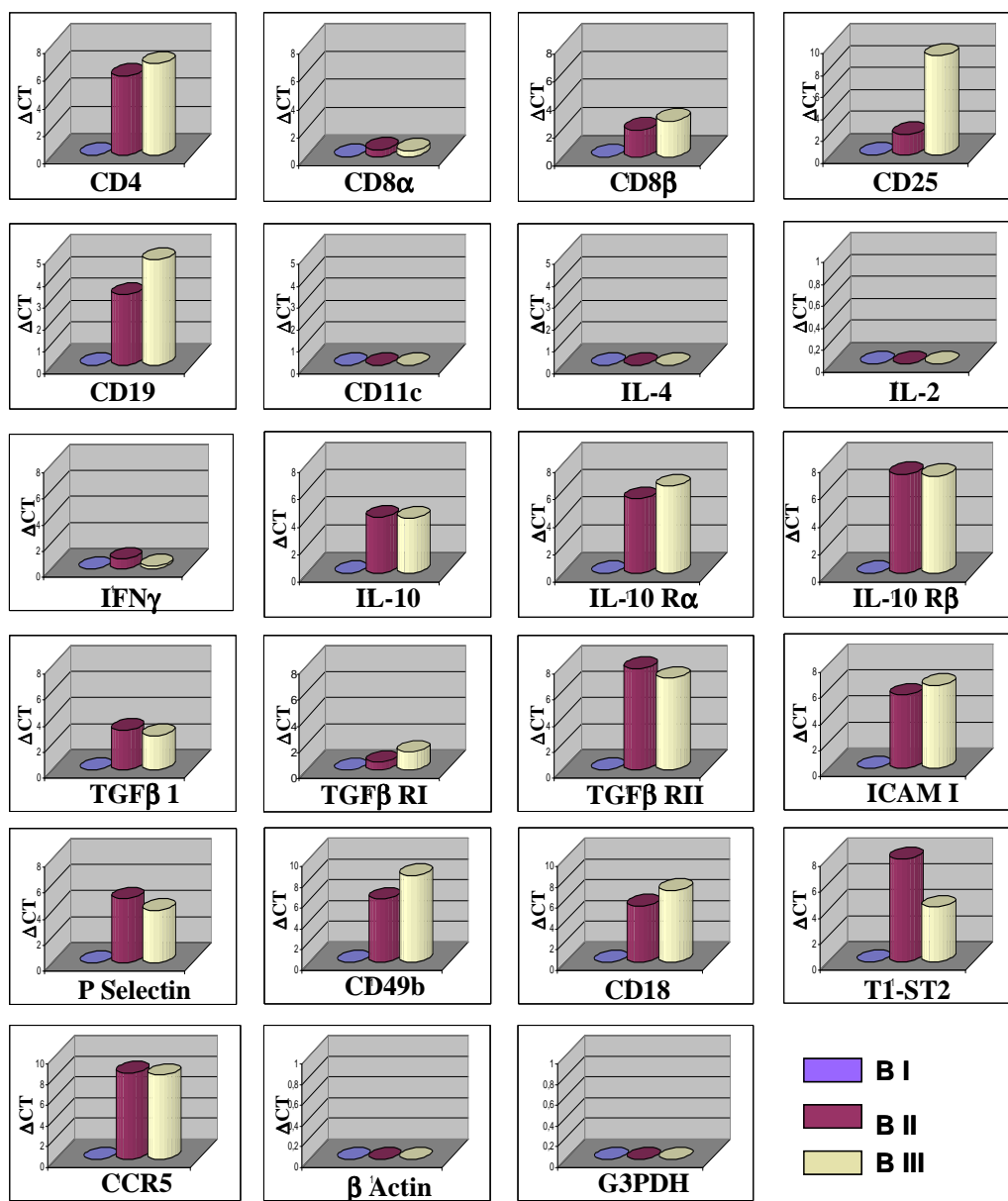


Figure 1

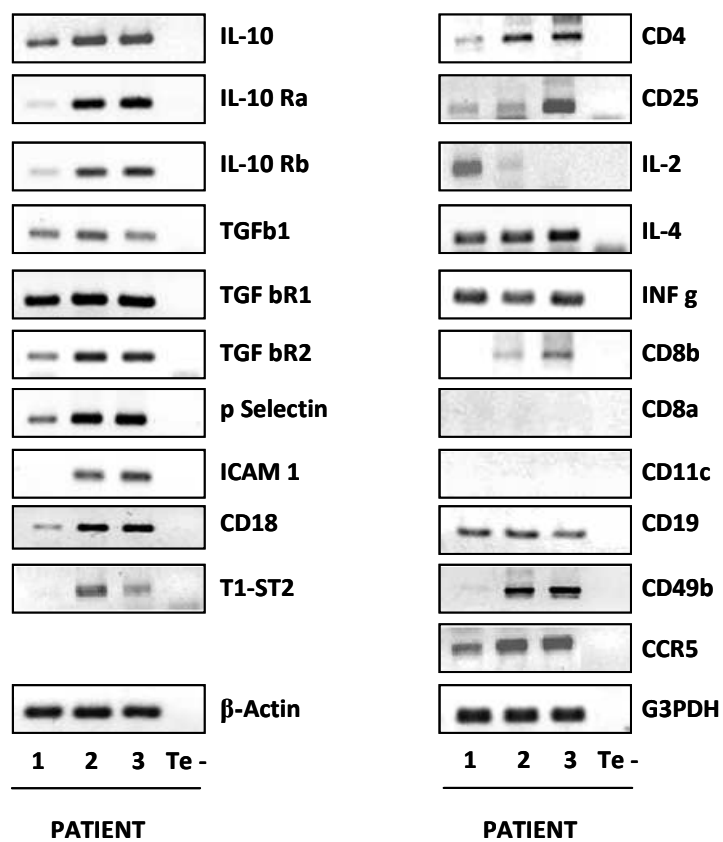


Figure 2

ARTICLE 2

Le Virus de l'Hépatite C Augmente la Fonction et Favorise le Recrutement des Lymphocytes T Régulateurs Humains Treg vers le foie

Hepatitis C Virus improves Tregs suppressive function and promotes their recruitment to the liver

En soumission

Laurissa Ouaguia, Olivier Moralès, Lynda Aoudjehane, Czeslaw Wychowski, Arnaud Carpentier, Jean Dubuisson, Yvan de Launoit, Yvon Calmus, Filomena Conti, Nadira Delhem.

Mots clés : VHC, JFH1, Lymphocytes T régulateurs, Chimiokines, Recrutement

Résumé : L'hépatite C est l'une des principales causes des maladies chroniques du foie. Son aggravation favorise le développement d'une cirrhose sévère, d'une insuffisance hépatique et la progression vers le carcinome hépatocellulaire (CHC). A ce stade, le seul traitement efficace reste la transplantation d'un foie sain. Malheureusement, les patients transplantés pour cause de cirrhose virale C sont exposés à un risque accéléré et très élevé de réinfection du greffon. Ainsi, pour mieux comprendre l'issue de l'infection par le virus l'hépatite C (VHC), il apparaît primordial d'étudier les réponses immunitaires de l'hôte et les mécanismes de régulation associés. En effet, dans des conditions physiologiques, la résolution et le contrôle de l'infection par le VHC sont assurés par les réponses cellulaires vigoureuses des lymphocytes TCD4+ et TCD8+ spécifiques du VHC et capables de reconnaître différents épitopes viraux. Cependant, la défaillance de ces réponses, qui peut être due aux caractéristiques de l'hôte et/ou du virus est généralement associée à la chronicité de la maladie. Une des explications de la persistance virale réside en l'altération de la réponse immune anti-virale médiée par une activité importante des lymphocytes T régulateurs. En effet, ces dernières années, une attention particulière a été portée sur la contribution de ces lymphocytes T régulateurs dans la progression de l'infection associée au VHC. Ainsi, de nombreuses études, dont les nôtres, ont montré l'implication des lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg ou Treg) et induits (Tr1, Th3) dans l'aggravation de la maladie. Plus précisément, les travaux du laboratoire ont décrit un recrutement important de ces 2 sous-populations au cours de l'évolution d'hépatite C vers la cirrhose et le CHC. Par conséquent, la différenciation, l'expansion et/ou le recrutement de lymphocytes T régulateurs semblent étroitement liés à l'histoire naturelle de l'hépatite C. Néanmoins, les mécanismes par lesquels le VHC pourrait induire la prolifération des Treg ou favoriser leur recrutement dans les sites d'infection demeurent incertains. Notre hypothèse est qu'il pourrait exister une interaction directe entre les lymphocytes T régulateurs et le virus de l'hépatite C. Dans cette étude, nous montrons que les Treg possèdent les récepteurs d'entrée du VHC et les protéines virales peuvent être détectées dans les Treg préalablement inoculés avec le virus. Nous démontrons également que l'inoculation des Treg avec le VHC entraîne une augmentation du phénotype régulateur et de l'activité suppressive des Treg. Par ailleurs, notre étude montre que le contact prolongé du VHC augmente progressivement la prolifération des Treg. Et enfin, de façon très intéressante, nos données montrent pour la première fois que les cellules hépatiques primaires infectées par le VHC, acquièrent une capacité significativement plus élevée à recruter les Treg humains, possiblement *via* un mécanisme CCL20-dépendant. En conclusion, l'interaction directe entre le VHC et les Treg humains représente un nouveau mécanisme qui pourrait potentialiser l'échappement du virus au système immunitaire et aussi promouvoir la progression de l'hépatite C.

Matériels et Méthodes : Les lymphocytes T régulateurs ont été isolés à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) provenant de poche de sang de donneur sains et après signature d'un consentement éclairé de participation (CPP-EFS). Après isolement, ces Treg sont phénotypiquement caractérisés par cytométrie en flux et fonctionnellement analysés par des tests de suppression. La mise en évidence des récepteurs et co-récepteurs d'entrée du VHC sur les Treg a été effectuée par PCR quantitative (RT-Q-PCR), cytométrie en flux (FACS), immunofluorescence (IF) et Western blot (WB). Une partie des Treg isolés a été mise en culture avec des particules VHCcc/JFH1 (inoculés) ou en culture dans du milieu DMEM récoltés après plusieurs passages de Huh7 non infectés (non-inoculés). Les particules virales VHCcc/JFH1 sont obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr J. Dubuisson qui a obtenu dans le cadre d'un MTA (Wakita), un accord d'utilisation du génome de taille complète JFH1 du virus de l'hépatite C. La transfection de ce génome dans les lignées d'hépatome humain Huh7 aboutit à la production de particules virales infectieuses sans mutations adaptatives qui sont produites en cultures cellulaires (VHCcc). Ainsi, ces particules virales ont été utilisées pour mimer l'action du virus de l'hépatite C.

Les Treg isolés ont été inoculés *in vitro* avec les particules virales de VHC à une MOI de 0.4 correspondant à 2 virus pour 5 cellules. La détection des protéines virales dans les Treg a été analysée par IF et WB. Par ailleurs, l'impact du VHC sur l'expression des marqueurs associés au phénotype régulateur et à la fonction suppressive des Treg a été évalué par RT-Q-PCR, FACS, ELISA et WB. En outre, le rôle du VHC sur l'expansion des Treg a été évalué par des expériences de prolifération cellulaire. Quant à l'impact direct du virus sur l'activité suppressive des Treg, il a été démontré par des tests de suppression (MLR) par incorporation de thymidine tritiée.

Finalement, nous avons étudié l'implication du VHC sur le recrutement des Treg par les cellules hépatiques primaires. En effet, les autres cellules d'intérêts dans notre étude sont les cellules du foie humain. Les cellules hépatiques (hépatocytes primaires et fibroblastes intra-hépatiques) ont été isolées à partir d'explants de greffes de foies et infectées *in vitro* par les particules virales du VHC à une MOI de 0.1 pour les hépatocytes et une MOI de 1 pour les fibroblastes intra-hépatiques. Le potentiel chimio-attractant des surnageants de culture de ces cellules sur les Treg humains a été mis en évidence par des tests de migration en chambre de boyden. Par ailleurs, l'expression des chimiokines spécifiques du recrutement des Treg a été analysée par RT-Q-PCR et ELISA sur les cellules hépatiques primaires infectées ou non. Enfin, la mise en évidence du rôle spécifique des chimiokines dans le recrutement des Treg a été évaluée par test de migration en chambre de boyden en présence d'anticorps bloquant de chimiokines.

Résultats et Discussion: Dans un premier temps, les analyses de cytométrie des Treg isolés *ex vivo* donnent une fréquence des Treg constituant environ 0.2% à 1.5% des PBMC circulants et 5% à 10% du pool total de CD4+. La pureté moyenne des Treg a été estimée à environ 95% à chaque isolement. Par la suite, nous avons étudié l'expression des récepteurs du VHC sur les Treg fraîchement isolés. Nos résultats montrent que les Treg naturels CD4+CD25^{+/high}CD127^{-/low} possèdent les principaux récepteurs CD81, CLDN1, LDLR et les corécepteurs OCLN, EGFR, TLR-2 et CD5 qui sont associés à l'entrée du VHC dans la cellule hôte. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T régulateurs naturels peuvent potentiellement accrocher le virus de l'hépatite C. Afin de mettre en évidence une internalisation du VHC dans les Treg, nous avons effectué des cultures de Treg en présence ou non des particules virales du VHC. 72H post-inoculation (72H p.i), les résultats montrent pour la première fois la détection des protéines virales E1, E2, Core et NS5A dans les Treg inoculés avec le VHC. Or, la plupart de ces protéines virales ne sont exprimées qu'à la suite d'une internalisation du génome viral, suggérant une internalisation du VHC dans lymphocytes T régulateurs humains.

Dans le but de déterminer l'impact du contact VHC sur le phénotype des lymphocytes T régulateurs, nous avons analysé l'expression des marqueurs phénotypiques des Treg après incubation avec le virus. De manière intéressante, l'analyse transcriptomique montre une augmentation de l'expression des marqueurs *CD4*, *CD25*, *FOXP3*, *CTLA4*, *LAG3* et une diminution du marqueur *CD127*. Cette augmentation de l'expression des gènes associés au phénotype des Treg a été confortée au niveau protéique par des analyses en cytométrie validant une augmentation significative du phénotype régulateur CD4+CD25^{+/high}CD127^{-/low} dans les Treg mis en culture avec le VHC.

De plus, les Treg naturels sont généralement décrits comme totalement anergiques *in vitro*, en particulier à cause de leur incapacité à exprimer et à produire des facteurs de prolifération. Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que le VHC induit une augmentation significative de la prolifération des Treg naturels. Des études mécanistiques suggèrent que l'expansion des Treg passerait par une augmentation de l'expression de *IL-2*, *IL-4*, *IL-15* et *BCL6*, qui sont des molécules importantes dans la prolifération lymphocytaire. De plus, nos travaux montrent que le VHC induit la sécrétion effective d'une cytokine impliquée dans la prolifération à savoir l'IL-2 avec un pic de sécrétion à 48H p.i. Le VHC favoriserait donc l'expansion des Treg. L'ensemble de ces données montrent que le VHC modifie le phénotype régulateur et augmente la fréquence des Treg naturels. Ces résultats pourraient expliquer les données de la littérature qui décrivent une augmentation de la fréquence des Treg au cours de la progression de l'hépatite C.

Nous avons également évalué le rôle direct du VHC sur l'activité suppressive des Treg $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}$. Par des expériences de suppression, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la capacité des Treg à supprimer la prolifération des PBMC autologues lorsque ces Treg étaient préalablement incubés avec le VHC. Par ailleurs, des analyses approfondies ont montré que le VHC augmentait bien l'expression de l'*IL-2RA* (CD25), *IL-24*, *IL35* (EBI3), *GZMB* et *TGF-β1* qui sont des marqueurs associés à la fonction suppressive des Treg. En outre, mes travaux ont montré que le VHC induisait une augmentation significative de la sécrétion de la cytokine immunosuppressive TGF-β1 par les Treg avec un pic atteint à 48H p.i. Ainsi, ces résultats sont en corrélation avec les données de la littérature qui décrivent une augmentation de la fréquence des Treg corrélée à une diminution de la réponse anti-virale effectrice chez les patients VHC+.

En outre, nos travaux montrent qu'en présence du VHC, les Treg augmentent significativement leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17. Or les données de la littérature décrivent bien une augmentation de la fréquence des cellules TCD4+ sécrétrices d'IL-17 chez les patients VHC+, associée à la progression des dommages au foie. Par ailleurs, d'autres études ont montré que les Treg pouvaient sécréter de l'IL-17 tout en conservant totalement leurs propriétés régulatrices. Ces données suggèrent donc qu'en plus de favoriser l'environnement immunosuppresseur, l'interaction Treg/VHC pourrait potentialiser les lésions hépatiques inflammatoires en faveur d'une progression de la maladie.

Par ailleurs, cette augmentation de l'activité suppressive et de la fréquence des Treg coïncide avec l'augmentation de leur recrutement par les cellules hépatiques infectées. Par des tests de migration en chambre de boyden, Mes travaux montrent que les surnageants des hépatocytes infectés attirent des quantités importantes de Treg. De façon intéressante, mes travaux démontrent que lorsque les Treg sont préalablement mis en culture avec le VHC, ils sont sensiblement plus attirés par les surnageants des cellules hépatiques. De plus, des analyses approfondies montrent que le VHC augmente significativement l'expression et/ou la sécrétion d'un ensemble de chimiokines associées au recrutement des Treg telles que CCL-20, CXCL-16 et CCL-17. Ces résultats sont corrélés au fait que le VHC augmente l'expression des récepteurs à ces chimiokines sur les Treg tels que *CCR-6*, *CXCR-6* et *CCR-4*. Nos travaux sont ainsi en accord avec les données de la littérature qui décrivent une augmentation du recrutement intra-hépatique des Treg chez les patients chroniques VHC+.

Conclusion : Cette étude montre pour la première fois que le virus de l'hépatite C est capable d'interagir directement avec les lymphocytes T régulateurs naturels humains afin d'aggraver l'environnement immunosuppresseur. En effet, les particules du VHC induisent une augmentation du recrutement hépatique des Treg, une potentialisation de leur phénotype régulateur, une augmentation significative de leur fonction suppressive et favorise leur expansion. L'ensemble de ces mécanismes suggère qu'il existe une coopération entre le VHC et les Treg permettant l'installation d'un environnement immunosuppresseur favorable à l'échappement du virus au système immunitaire.

Hepatitis C Virus improves Tregs suppressive function and promotes their recruitment to the liver

Ouaguia Laurissa (1,2), Morales Olivier* (2), Aoudjehane Lynda* (3,4), Wychowski Czeslaw (5), Carpentier Arnaud (6), Dubuisson Jean (5), de Launoit Yvan (2), Calmus Yvon (3,7,8), Conti Filomena (3,7,8), Delhem Nadira (1,2)

*Equally contributed authors

Running Title: Impact of HCVcc on Human Treg

Author's Affiliations:

- (1) Université Lille Nord de France
- (2) CNRS- UMR 8161 - Institut de Biologie de Lille- Institut Pasteur de Lille- SIRIC ONCOLille, France
- (3) UPMC Université Paris 06 & INSERM, UMR_S 938, CdR Saint-Antoine, France
- (4) Human HepCell, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France
- (5) Inserm U1019-CNRS UMR8204- Centre d'Infection et d'immunité de Lille, France
- (6) Liver Diseases Branch, NIDDK, NIH, Bethesda, Maryland, USA.
- (7) AP-HP Hôpital Pitié-Salpêtrière, Unité de Transplantation Hépatique, F-75013, France
- (8) Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75005, France

Key Words: HCV, JFH-1, Regulatory T cells, Chemokines, Recruitment

Correspondance to:

Nadira Delhem, PhD

Institut de Biologie de Lille

1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex

Phone : +33 3 20 87 12 53

Fax : +33 3 20 87 10 19

Email: nadira.delhem@ibl.cnrs.fr

ABSTRACT

BACKGROUND and AIMS: Although a major role of regulatory T cells (Tregs) has been established in the progression of hepatitis C, nothing is yet known regarding the direct impact of hepatitis C virus (HCV) on Tregs. To investigate this aspect we studied the ability of Tregs to internalize HCV and the subsequent effect on their suppressive function and phenotype. Moreover, we evaluated how HCV could promote the recruitment of Tregs by infected primary human hepatocytes.

METHODS: Tregs of healthy donors were incubated with JFH-1/HCVcc. Viral inoculation was assessed using adapted assays (RT-QPCR, FACS, WB and immunofluorescence). Level expression of Tregs phenotypic markers (CD4, CD25, CD127 and Foxp3) and functional markers (IL-10, GZMB, TGF- β 1 and IL-2) were monitored by Q-PCR, flow cytometry and ELISA. Suppressiveness activity was validated by MLR assays. Tregs recruitment by infected primary hepatic cells was evaluated using Boyden Chamber.

RESULTS: Tregs express the classical HCV receptors and can internalize HCV particles leading to the detection of the viral proteins (E1, E2, Core and NS5A). HCV inoculation significantly increases the suppressive phenotype and activity of Tregs, and raises their anergy. Moreover, HCV infection induces the expression of chemokines (CCL17, CCL22, CXCL16, and CCL20) by primary hepatic cells and of chemokine receptors (CCR4, CXCR6 and CCR6) by Tregs. Finally, infected hepatic cells have a significantly higher potential to recruit Tregs in a seemingly CCL20 dependent manner.

CONCLUSIONS: Direct interaction between HCV and Tregs represents a newly defined mechanism which could potentiate HCV immune evasion thus promoting the progression of the hepatitis C disease.

Abbreviations used in this paper: CCL, chemokines (C-C motif); CD, cluster of differentiation; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; CXCL, chemokine (C-X-C motif); E1, envelop glycoprotein 1; EGFR, epidermal growth factor receptor; ELISA, enzyme-linked immunosorbant assay; FACS, fluorescence-activated cell sorting; Foxp3, forkhead box protein 3; GZMB, granzyme B; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; IF, immunofluorescence; IHF, intra-hepatic fibroblast; LAG3, lymphocytes activating gene 3; IL-10, interleukin 10; mRNA, messenger ribonucleic acid; NS5A, non structural protein 5A; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; p.i., post-inoculation PHH, primary human hepatocytes; Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction; TGF- β 1, transforming growth factor β 1; TLR, toll like receptor; Tregs, regulatory T cells; TR1, regulatory T cell type 1; WB, western Blot.

INTRODUCTION

Hepatitis C is one of the major causes of chronic liver diseases affecting over 180 million people worldwide ¹. HCV infection is a persistent disease; while the majority of patients remain asymptomatic some develop end-stage liver diseases including chronic liver disease, cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma ²⁻⁴. Indeed, after a subclinical phase, more than 80% of the patients progress to persistent HCV infection. The clearance or persistence of the virus is strongly determined by the patient's immune response ⁵. Hepatitis C is both a viral disease and a liver disease. The current tri-therapy approach (combination of pegylated interferon-alpha, guanosine analogue (ribavirine) and viral protease inhibitors) to treat chronic HCV infection had relative success with several side effects. Recently more efficient Direct Acting Antiviral drugs (DAA) have been developed capable of controlling and reversing the viral disease state, however they have no impact on advanced liver disease ⁶. Therefore, studying the host immune responses is essential to understand the outcome of HCV infection.

Hepatitis C virus (HCV) is a hepatotropic, non-cytopathic, enveloped virus belonging to *Flaviviridae* family with a host range limited to human and chimpanzees ⁷. It is a small enveloped virus whose RNA genome consists of a large open reading frame encoding a ~3000 amino acid polyprotein precursor, which is cleaved by cellular and viral protease to yield the Core, envelope (E1, E2) and non-structural protein (P7-

NS5B)⁸. HCV entry in host cells involves main cellular receptors known as CD81, Claudine1, LDLR, SCARB1 and Occludin⁹. Numerous molecular and clinical evidence have indicated that HCV may also affect cells of the immune system suggesting the implication of immune cells in the viral outcomes¹⁰. Indeed, some studies have highlighted the importance of CD5 and TLRs co-receptors on HCV entry within immune cells¹¹. Physiologically, resolution and control of primary HCV infections is associated with a vigorous HCV-specific CD4+ and CD8+ T cells responses to multiple epitopes derived from both structural and non-structural proteins¹². Indeed, following HCV infection, liver cells express and present the viral antigens to CD4+ T and CD8+ T cells which are able to clear the virus by non-cytolytic and cytolytic effector functions. In contrast, the development and persistence of a chronic infection is linked to a weak or absent HCV-specific Th1 response along with the presence of Th2 cytokines (IL-4 and IL-10)^{13, 14}. Many studies have described a failure of both innate and adaptive immune responses partly due to viral mutation and escape linked to both CD4 and CD8 T cells failure, decrease of proliferation, impaired effector functions, CD4 T cells anergy, CD8 T cells exhaustion, impaired cytokine production, altered dendritic cell function and induction of regulatory T cells¹⁴.

Regulatory T-cells are specialized subsets of the adaptive immune response that are able to recognize self-antigen peptides presented by MHC class II through their TCR. Tregs suppress the auto-reactive T cells, reduce inflammation, induce tolerance and modulate the immune response of the host in the context of autoimmune pathologies, allergy or Virus-induced cancers¹⁵⁻¹⁷. Based on their origin and their major mechanism of action, we can distinguish thymic-derived Tregs called "natural Treg (nTreg or Treg) "cells and periphery-induced Tregs also known as induced Tregs (iTreg). Natural Tregs are the best known and they are characterized by simultaneous expression of both CD4, CD25 (interleukin (IL)-2 receptor α) surface markers and the absence or a sub-expression of CD127 (IL-7 receptor α)^{17, 18}. Their mechanisms of immune suppression depend on both cell-to-cell contact and immunosuppressive cytokine secretion¹⁹. These Treg employ varying mechanisms to exert a remarkably strong suppressive activity on the different components of the immune system including lymphocytes, natural killer cells and antigen presenting cells. Although Treg play a crucial role in physiological immune homeostasis, it has been shown that extrinsic regulatory pathways are also involved in HCV-specific response^{20, 21}.

Recently, attention has focused on the contribution of Tregs to hepatitis C progression. Indeed, HCV persistence is linked to viral proteins Core, NS3, NS4 and NS5 that inhibit T cell function by altering the antigen presentation by DCs, leading to the development of a weakened immune response²². The weakening of the patient's immune response is also partly due to the elevated frequency of intra-hepatic and circulating Treg^{20, 21}. In fact, Treg have been suggested to contribute to HCV-specific CD8+ T cell dysfunction through the secretion of IL-10 and TGF- β and also through expression of CD25, CLTA4 and LAG3^{23, 24}. We and others have shown that Treg and Tr1 cells are over-expressed in patients with severe hepatitis C recurrence compared to those without or with minor recurrence^{23, 25-27}. Moreover, few studies have highlighted the role of chemokines CCL17 and CCL22 in the intra-hepatic Treg recruitment²⁸. Results suggest that Treg and Tr1 cells are involved in HCV progression and recurrence after liver transplantation. Hence, the differentiation and/or the recruitment of intra-hepatic regulatory T-cells are probably key factors of the disease progression. However, the mechanisms by which HCV might induce the proliferation of Treg or their recruitment to the sites of infection are less known.

Few studies have evaluated the involvement of Tregs in the accelerated progression of hepatitis C, especially after liver transplantation but none have studied the direct impact of HCV on Treg. Thus, in this study, we reported that Treg possess the classical HCV receptors and can internalize the virus. We also proved that HCV inoculation increased the phenotype and suppressive function of Treg which are correlated with transcriptional activation and production of suppressive factors. Very interestingly, we also showed that HCV induced *in vitro* Treg proliferation. Finally, we observed that HCV inoculation increased the Treg recruitment by primary human hepatocytes, suggesting a key role of Treg play in modulating the hepatic immune response to HCV infection.

MATERIALS AND METHODS

Donors and isolation of Immune cells

Human blood samples were collected from healthy adult donors after obtaining informed consent in accordance with the approval of the Institutional Review Board at the Biology Institute of Lille. Peripheral

blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on Ficoll-Paque™PLUS gradient (GE HEALTHCARE, France), washed with Phosphate Buffer Saline (Life Technologies, France) and passed through a 100µm sterilized nylon filter (Saati, France). CD4+ natural regulatory T-cells (Treg) and CD4+ conventional T-cells (Tconv) cells were isolated from filtered PBMC, using CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec GmbH, Germany) according to the manufacturer's instructions. Obtained Treg frequency was around 0.2% to 1.5% of circulating PBMC and 5% to 10% of total peripheral CD4+T cells. And Treg Purity was higher than 95% determined by flow cytometry. Analyses of immune samples are described in the Supplementary Materials and Methods sections.

Graft donors and isolation of Hepatic cells

Human primary hepatic cells were isolated from patients undergoing partial hepatectomy for treatment of colorectal cancer metastases and all were seronegative for HCV, HBV and HIV. The procedures for cell isolation were carried out in accordance with the approval of the CPP (Comité de Protection des Personnes) and as previously described^{29, 30}. Briefly, The liver tissue fragments were perfused, first with Liver Perfusion Medium (Invitrogen, France) at 37°C for 15 min, and then with collagenase and dispase-containing Liver Digest Medium (Invitrogen) at 37°C for approximately 15 min, until the tissue was completely digested. Cells were dispersed by gentle shaking, filtered and centrifuged at a low speed. Primary human hepatocytes (PHH) were collected from the pellet and used in primary culture, as previously described²⁹. The non-parenchymal cell fraction was collected from the supernatant which was centrifuged to obtain liver intra-hepatic fibroblasts (IHF), as described elsewhere^{30, 31}.

Antibodies and Reagents

Antibodies and reagents used in flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence, western blot assay and migration assays are described in the supplementary Materials and Methods sections. The FACSCalibur instrument powered by CellQuest Pro software (Becton Dickinson, USA) was used for flow cytometry and analysis was performed using Flow Jo software (Tree Star Inc. Ashland, USA).

***In vitro* Cell Proliferation and Viability Assay**

In vitro PBMC and Treg proliferation assays were performed as described in the Supplementary Materials and Methods sections.

***In vitro* Treg Suppression Assay (Mixed Leukocyte Reaction)**

In vitro Treg suppressive assays using purified Treg and PBMC cells were performed as described in the Supplementary Materials and Methods sections.

***In vitro* PBMC Lysis assays**

In vitro PBMC Lysis assay using PBMC and Tregs was measured as described in the Supplementary Materials and Methods sections.

Culture Conditions and Viral inoculation

We obtained infectious HCV virions produced in cell culture (HCVcc) after transient transfection of full genome (JFH-1) in Huh7 cell lines. Huh7 cells were cultured in complete DMEM Glutamax medium (Invitrogen, UK). Isolated Treg and PBMCs cells were cultured in flat bottom 48well plates at a rate of 1.2 to $1.5 \cdot 10^6$ cells per well and activated as described in the Supplementary Materials and Methods sections. Cells were incubated for 3, 24, 48 or 72 hours in the presence of HCVcc/JFH-1(MOI 0.4) in complete DMEM Glutamax medium. Isolated primary hepatic cells were, in turn, infected in the same manner with MOI 0.1 for hepatocytes and MOI 1 for fibroblasts. Negative control of inoculation was carried out by cultivating the cells in conditioned medium obtained after several passages of non-infectious Huh7. Culture media of non-infected Huh7 cells were used as negative control.

Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Primers and reagents to quantify markers related to Treg phenotype, activity, proliferation and recruitment were obtained from different manufacturer (QIAGEN, Sigma Aldrich, Invitrogen and Amersham Biosciences) (see table I). Sample preparation, reverse transcription, polymerase chain reaction and quantitative evaluations were performed as described in the Supplementary Materials and Methods sections.

Migration Assay

Treg were harvested and resuspended in DMEM at 10^6 cells/mL with or without HCVcc inoculation. Chemotaxis experiments were performed with the supernatant of primary human hepatic cells culture (PHH and IHF) either infected or not and in the presence or absence of blocking mAbs anti-CCL20, anti-CXCL16 and anti-CCL17 (PeproTech, USA) at different concentrations. DMEM and SDF1 α (10^{-7} M) (PeproTech, USA) were used as negative and positive controls respectively. h-rec-CCL20 (50ng/mL), h-rec-CCL17 (10ng/mL) and h-rec-CXCL16 (100ng/mL) were also used as a specific controls. Each condition was performed in triplicate. Cells that migrated through the 5 μ m filter of the inferior wells were counted by at least two different people. Results were presented as index of migration compared with the negative control DMEM.

Statistical analysis

Results are given as mean \pm SEM. Data was analyzed using Prism 6.0 software (Graph Pad Software Inc.). All quoted *P*-values are two-sided, with $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.001$ (**), $P \leq 0.0001$ (***) and $P \leq 0.00001$ (****) being considered statistically significant for the first and highly significant for the others.

RESULTS

Characterization of freshly isolated natural human regulatory T cells

We first characterized the phenotype and function of freshly isolated Treg. Cytometric analysis showed that 95.8% of freshly isolated Treg are CD4⁺CD25^{high} and 94.5% are CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} (Figure S1A). Further analyses reveal that Tregs are totally anergic *in vitro* and significantly inhibit the PBMC cells proliferation (Figure S1B) principally through cell-lysis mechanisms in a dose dependent-manner (figure S1C). These results clearly showed that isolated Tregs are functional.

Circulating CD4⁺CD25^{+/high}CD127^{-/low} Tregs possess the classical HCV entry receptors

Our first question was to highlight the presence of HCV entry receptors on isolated Tregs. Recent evidences have suggested that circulating immune cells may express some protein receptors associated

with the entry of HCV, indicating a possible immunotropism^{32, 33}. These observations were further verified in the present study where isolated Tregs display messenger RNA expression of *CD81*, Claudine1 (*CLDN1*), and low density lipoprotein receptor (*LDLR*) (Figure1A). *CD81* and *LDLR* RNA expressions seem to be higher in Tregs compare to control Huh7 whereas *SCARB1* and *CLDN1* RNAs expressions are respectively lower and similarly expressed (Figure 1A). These transcriptomic results were confirmed with three different protein analyses (FACS, IF and WB) that clearly indicate the presence of CD81, CLDN1 and LDLR HCV entry receptors on Tregs, PBMC and Huh7 used as control (Figure 1B, C and D). In addition, our study reveals that Tregs possess HCV entry coreceptors such as EGFR, OCLDN, CD5 and TLRs (Figure S2 and S3). Further experiments also show that HCV inoculation may increase the expression of entry receptors and coreceptors on Tregs and (Figure S3). These experiments suggest that Tregs could potentially interact with HCV.

HCV viral proteins E1, E2, Core and NS5A can be detected within Tregs

Some studies have suggested that peripheral immune cells may internalized the HCV virus³³. To visualize HCV internalization into CD4⁺CD25^{+/high}CD127^{-/low} Tregs, we performed IF assay on Tregs compared to Huh7 used as control. As shown in Figure 2, HCV structural viral proteins Core, E1 and E2 as well as the non-structural viral protein NS5A were detected in HCV inoculated Tregs while non-inoculated Tregs did not (Figure 2A). These experiments were further confirmed by WB analyses demonstrating that viral proteins can be detected into Tregs after HCV inoculation (Figure 2B). These data suggest that HCV can be internalized into human Tregs.

HCV inoculation significantly modifies the suppressive phenotype of Tregs

Previous work have shown an increased of intra-hepatic and blood Tregs frequency in HCV infected patients^{23, 25, 26}. However, the mechanism involved in the aggravation of the immunosuppressive environment remains unclear. As shown in Figure 3, HCV inoculation significantly increases the expression of Tregs suppressive phenotype (Figure 3). Indeed, Results showed that HCV inoculation increases the mRNA expression of *CD4*, *CD25* and *FOXP3* at 3 hours post-inoculation (3H p.i) (Figure 3A) and *CD4*, *CD25*, *FOXP3*, *CTLA4* and *LAG3* at 24H p.i (Figure 3B) with at least 5 fold change compare to control cells. In addition, we observed an increased percentage of the suppressive phenotype CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ within

Tregs at 3H p.i (34.2% vs 13.4%) and 24H p.i (30.4% vs 17.2%) (Figure 3C). Further analyses reveal that CD4⁺CD25^{high} T cells subset were 98.525% vs 99% and 91.275% vs 93.050% respectively at 3H p.i and 24H p.i within inoculated Treg compared to non-inoculated cells (Figure S4A). In addition, CD25^{high}CD127⁻ subsets were significantly higher in inoculated Treg (36.40% vs 18.78% and 28.175% vs 12.048% respectively at 3H p.i and 24H p.i . (Figure 4B) compared to non-inoculated cells (Figure S4B). There was no significant difference on CD4⁺CD25^{high} subsets within inoculated Treg compare to freshly isolated Tregs neither at 3H nor at 24H p.i (Figure S4C). In addition, there was a significant increase of CD25^{high}CD127⁻ subsets, 36.40% vs 14.695% and 28.175% vs 14.695% respectively at 3H p.i and 24H p.i. within inoculated Treg and freshly isolated Tregs (Figure S4D). These results were highlighted in 4 independent experiments showing that HCV inoculations significantly increases percentage of highly Tregs CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ (Figure 3D). Moreover, extensive analyses reveal that HCV inoculation increases the expression of 22 markers related to Treg phenotype (data not shown). Therefore, HCV inoculation seems to be associated with an increase of Treg suppressive phenotype.

HCV inoculation improves the *in vitro* proliferative capacity of Tregs

Natural Tregs are also described as totally anergic *in vitro* due to their inability to express and produce proliferative factor³⁴. Hence, we analyzed the impact of HCVcc inoculation on Treg cell proliferation. Both viability assay by cell counting and (³H)-thymidine incorporation assays showed that HCV inoculation effectively increases CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} Treg proliferation with time (Figure 4A, 4B and 4C). To highlight the underlying mechanism, we performed transcriptomic analyses showing a decrease in the expression of several molecules related to lymphocytes proliferation such as *IL-2*, *IL-4*, *IL-15*, *BCL6* associated with an increase of the proliferative inhibitory factor *BLIMP1* in Treg cell at 3H p.i (Figure 4D). In contrast, at 24H p.i, there was an increase of all the proliferative factors especially *IL-2* and *IL-15* by Tregs (Figure 4E). Further experiments show an effective increase of IL-2 secretion at 48H p.i by Tregs (Figure 4F), suggesting that HCV inoculation can favor the Treg proliferation.

HCV inoculation increases the suppressive activity of Tregs

Natural Tregs suppress the immune responses principally through contact-dependant mechanisms but also by the expression of many suppressive factors¹⁹. In our study, Tregs were previously cultured with HCV particles for 24H or cultured with supernatant of non-infected Huh7 for negative controls. Then, we made co-culture of PBMC and washed Tregs at 2:1 ratio for 48H in activated conditions. By (³H)-thymidine incorporation assays, we demonstrate that HCV inoculation significantly increases the capacity of Tregs to inhibit the PBMC proliferation (Figure 5A). Mechanistic analyses reveal that HCV inoculation increases the expression of suppressive factors *IL-2RA* (CD25), *IL-35* (EBI3 sub unit), Granzyme B (*GZMB*) and *TGF-β1* at 3H and 24H p.i (Figure 5B and 5C). Furthermore, we evaluated the secretion of immunosuppressive cytokines. Results demonstrate that HCV inoculation increases the secretion of TGF-β1 at 48H p.i by Tregs (Figure 5D) but did not change the IL-10 secretion (Figure 5E). Our study also shows that HCV inoculation increases the gene expression and the effective secretion of several pro-inflammatory cytokine such as IL-17 and IFNγ by Tregs (Figure S5). These data clearly show that HCV not only improve Treg cell phenotype but also increase its suppressive and harmful activity.

CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ Tregs are recruited by infected human hepatic cells supernatants

To examine whether supernatants of *in vitro* infected PHHs could attract more Tregs than supernatants of non-infected PHHs, Boyden chamber migration assays were performed. Natural Tregs obtained from PBMC of healthy donors were placed in the upper chamber of a Boyden system (containing a 5µm pore size filter), while supernatants of PHH cultures were applied in the lower chamber. After 3H, the number of Treg attracted was estimated. As shown in Figure 6A, both supernatants induced migration of CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ Tregs but the proportion and number CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ Tregs was significantly higher when using supernatant of infected PHHs. Importantly, Treg recruitment by infected PHHs was comparable to the one induced by the positive control SDF1α (Figure 6A, grey bars). Otherwise, no significant differences have been observed between non-infected PHH supernatants and control medium DMEM on Tregs recruitment (Figure 6A). In addition, when Tregs were previously cultured with HCV, there was a significant increase of the recruitment regardless of the supernatant (Figure 6A). Transcriptomic

experiments show that HCV infection increases the expression of several chemokines such as *CCL20*, *CCL17* and *CXCL16* by PHHs (Figure 6B). In addition, our analyses also reveal that HCV inoculation increases the expression of corresponding chemokine-receptors such as *CCR6*, *CCR4* and *CXCR6* by Tregs at both 3H p.i and 24H p.i (Figure 6C). Furthermore, we evaluated the effective secretion of 3 chemokines by PHHs and results showed that HCV infection seems to increase the secretion CCL20 (Figure 6D, left panel) but do not really change the secretion of CCL17 and CXCL16 (Figure 6E and 6F, left panels). Importantly, the addition of neutralizing antibodies against CCL20, CCL17 and CXCL16 to the infected PHH supernatant significantly inhibits the recruitment of Tregs (Figure 6D, 6E and 6F, right panels). These data strongly suggest that HCV-infected hepatocytes promote the recruitment of Tregs to the liver. Other analyses revealed that IHFs incubated with HCVcc do not exhibit increased chemo-attractant abilities, as demonstrated by similar migration index as DMEM (Figure 7A) and no increased secretion of CCL20, CCL17 and CXCL16 upon HCV inoculation (Figure 7B).

DISCUSSION

Tregs induce tolerance, reduce inflammation and modulate the immune response of the host in the context of autoimmune pathologies, cancers or virus infections¹⁵⁻¹⁷. HCV infection is a persistent disease and a leading cause of end-stage liver diseases including chronic liver disease, cirrhosis and hepatocellular carcinoma²⁻⁴. The severity of immune cell dysfunction during chronic HCV correlates directly with the progression of the disease^{20, 27}. Recently, attention has focused on the contribution of Tregs to hepatitis C progression^{20, 21, 27}. Nevertheless, no study have addressed the direct impact of HCV on Tregs and the mechanisms by which HCV might increase frequency of Tregs or improve their recruitment to the infected liver are less known. In this study, we showed that CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} Tregs do have the classical HCV entry receptors CD81, CLDN1, LDLR and coreceptors OCLN, EGFR, TLR2 and CD5. Intracellular immunodetection of Core and NS5A viral proteins in our study suggest a probability of internalization of HCV into Tregs because some of these proteins are expressed only after an effective viral internalization⁹. We and another groups previously showed an increase in blood and intra-hepatic CD4⁺CD25⁺ Treg and Tr1 cells in patients with chronic HCV infection^{23, 25-27}. In the present study, we recorded that co-culture of HCV

particles with Tregs induces a significant increase of Treg number by inducing the secretion of IL-2 and promote their suppressive phenotype and activity. More interestingly, we reported that HCV infection significantly increases the recruitment of Tregs by hepatocytes. Therefore, a direct impact of HCV on Tregs contributes to the high prevalence of hepatitis C chronicity and persistence in infected patients.

The exact mechanisms involved in the failure of the host immune system to fight HCV remain obscure. An intriguing hypothesis would suggest that HCV particles can modulate host immune response. Isolation of a full length genome (JFH1) from serum of an HCV infected patient and its transfection into human hepatoma cells line (Huh7) have lead to the production of cell-cultured HCV infectious viral particles (HCV), without adaptive mutations, which are completely identical to entire HCV genome³⁵. However, their impact on human Tregs has never been investigated. In this study, we addressed the role of HCV inoculation on CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} Tregs and we use supernatant of non-infected Huh7 as negative controls. By using both quantitative polymerase chain reaction, flow cytometry, immunofluorescence and western blot assays, we have shown that CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} Tregs express the receptors CD81, claudine 1 (CLDN1) and low density lipoprotein receptor (LDLR) (Figure 1) which have been clearly associated with HCV entry in host cells^{9, 32}. In addition, our study reveals that Tregs also express epidermal growth factor (EGFR), occludine (OCLDN), CD5 and toll-like receptors 7/9 (Figure S2). TLR7/9 are intracellular receptors that sense viral nucleic acid and CD5 have being recently described as the major HCV entry receptor on T lymphocytes^{11, 36, 37}. Thus, their presence on freshly isolated human Tregs clearly suggests that Treg can be inoculated by HCV. Furthermore, additional experiments showed an increased gene expression of HCV entry receptors and coreceptors *CD81*, *CLDN1*, *SCARB1*, *EGFR*, *OCLN*, *CD5* and *TLR4,7,8,9* on Tregs after HCV inoculation from the early stage of infection (Figure S3), suggesting that HCV inoculation renders Tregs more sensitive to infection. However effective viral internalization wasn't yet proved. Here, we report that a significant percentage of CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} Tregs were also stained positive for HCV E1, E2, Core and NS5A proteins after HCV inoculation (Figure S2). Most of these viral proteins are expressed only after HCV genome internalization³⁸, thus, their detection in Tregs is an indication of efficient HCV inoculation. These data correlates with studies showing that HCV successfully bind and enter PBMCs³⁹.

In order to investigate the potential of HCV entry to modulate the immune profile of Tregs, we challenged human peripheral Tregs from healthy donors with HCV particles and we studied their phenotypical and functional changes at various time points p.i in activated condition. We examined the expression of selected inhibitory markers on the Tregs which are known to play important role in both acute and chronic HCV infection⁴⁰. Interestingly, *CD4*, *CD25* and *FOXP3* expressions on Tregs were elevated at 3H and 24H p.i (Figure 3A, 3B), which is in accordance with the finding that CD4+CD25^{high}FOXP3+ Tregs constitute the most suppressive phenotype of Tregs⁴¹. We also found that Tregs highly express the inhibitory markers *CTLA-4* and *LAG3* after HCV inoculation. This is consistent with previous studies reporting that exhausted T cells expressed inhibitory markers in chronic HCV infection and that their trafficking from intracellular vesicles to the cell surface determines T cell activation⁴². Our study also revealed that the surface expression of CD4 and CD25 markers on Tregs increase reaching significant levels at 3H and 24H p.i, compared to the control group (Figure 3C, 3D). Interestingly, we recorded a concomitant decrease of CD127 expression levels on Tregs (Figure 3) which is associated to the most suppressive Treg phenotype^{43, 44}. This observation implies that HCV challenge potentially leads to loss of CD127 and leads to increase of CD4, CD25 and FOXP3 expressions, leading to an exhausted Treg phenotype through CD25, CTLA-4 and LAG3 expression. This exhausted phenotype has been extensively addressed by studying the concomitant distribution of CD4/CD25 and CD25/CD127 markers on Tregs (Figure S4). Our study show an increase percentage of CD4+CD25^{high} and CD25^{high}CD127⁻ within Tregs at 3H and 24H p.i, compared to non-inoculated cells (Figure S4). Taken together, these observations support the idea that HCV inoculation significantly increases the suppressive phenotype of Tregs. More surprisingly, our data revealed an increase proliferation of *in vitro* activated Tregs at 24H, 48H and 72H p.i (Figure 4A, 4B, 4C). This was really surprising because natural Tregs are often described as totally anergic *in vitro* due to their inability to produce proliferative factors³⁴. By transcriptomic analyses, we showed that HCV inoculation decreases the expression of *BLIMP1* and gradually increases the gene expressions of *IL-2*, *IL-4*, *BCL6* and *IL-15* (Figure 4D, 4E) closely related to T cell proliferation^{45, 46}. These data were confirmed by an effective secretion of the proliferative cytokine IL-2 by Tregs, reaching significant levels at 48H p.i (Figure 4F), suggesting that HCV inoculation profoundly alters the Tregs phenotype.

Natural Tregs exert a remarkably strong suppressive activity on different components of the immune system by both cell-to-cell contact mechanisms and immunosuppressive cytokine secretion¹⁹. In HCV-infected patients, these mechanisms contribute to the inhibition of the host antiviral immune response¹⁴. However, neither the mechanism of this immune regulation, nor whether HCV can improve the Treg suppressive activity is incompletely understood. In this study, we show that HCV inoculation significantly increases the Treg suppressive activity on PBMC proliferation (Figure 5A). We inquired into the mechanism underlying this inhibitory activity by evaluating the expression of several markers related to Treg function. Results show an increased expression of *IL-2RA (CD25)*, *IL35 (EBI3)*, *GZMB* and *TGF-β1* at 3H and 24H p.i (Figure 5B, 5C). Tregs also up-regulated the secretion of the immunosuppressive cytokine TGF-β1 at 48H p.i (Figure 5D), which agree with previous reports in HCV-infected patient describing an increase frequency of Tregs positively correlated to a decrease of the host-immune response¹⁴. Another interesting observation is that Tregs display an increased expression of *IL-12*, *IL-17*, *IL-21* and *IL-23* pro-inflammatory cytokines after HCV inoculation both at 3H p.i and 24H p.i (Figure S5A, S5B). Moreover, at 48H p.i, Tregs secrete larger amounts of IL-17 cytokine (Figure S5C) and this result is consistent with findings showing that IL-17-secreting T cells are enriched within the liver of HCV infected patients⁴⁷. Furthermore, other studies have shown that IL-17-producing human Tregs retain efficient suppressive function⁴⁸. Taken together, our data clearly suggest that by its suppressive and harmful inflammatory activity, Tregs worsen the suppressive microenvironment and favor liver damages in HCV-infected patients.

This enrichment in the suppressive activity and frequency of Treg cell coincides with their high recruitment by infected hepatic cells. Some studies have mentioned that HCV induces the expression of chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection, suggesting that HCV engenders an immunosuppressive environment within the liver which impairs the activity of antiviral immune response^{27, 28}. Nevertheless, little is known about the mechanisms by which HCV induces Tregs recruitment. By performing Boyden chamber migration assays, we show herein that supernatant of infected primary human hepatocytes (PHH) induce migration of CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ natural Tregs and the number was substantially greater when these Treg cell were previously incubated with HCV (Figure 6A). Importantly, Treg recruitment by infected PHH was comparable to the one induced by the positive control SDF1α and these

recruitments were significantly higher compared to the one induced by control medium (DMEM) and non-infected PHH supernatants respectively (Figure 6A). These data clearly show that hepatocytes favor the recruitment of Tregs in HCV-infected patient. Furthermore, detailed experiments reveal that mRNA levels of Treg-attractive chemokines like *CCL17*, *CCL20* and *CCLX16*^{28, 49} are increased in infected hepatocytes as compared to non-infected hepatocytes (Figure 6B). In addition, mRNA expressions of corresponding chemokines-receptors such as *CCR4*, *CCR6* and *CXCR6* were also shown on inoculated Treg (Figure 6C). In addition, our data confirmed an increased secretion of CCL20 by infected PHHs and the addition of neutralizing antibodies against CCL20, CCL17 and CXCL16 to the supernatant of infected PHH significantly inhibits the recruitment of Tregs (Figure 6), suggesting that Treg recruitment to the liver can be favored by these chemokines. Taken together, our observations are consistent with studies showing an increased recruitment of natural Treg to the liver in HCV-infected patients^{28, 49}. We also addressed whether HCV may influence the chemotactic potential of Intra-hepatic fibroblasts (IHF) which are other important liver cell components^{20, 21, 50}. Our results reveal no significant differences in the Treg recruitment between supernatants of inoculated intra-hepatic fibroblasts compared to non-inoculated IHF supernatants as well as no significant difference in the CCL20, CCL17 and CXCL16 secretion upon HCV inoculation (Figure 7). This result is interesting because the permissivity of IHF to HCV is highly debated and their role in the hepatic pathology may not be linked to the immune response but to the increase of fibrosis³⁰. Taken together, our results show that the intra-hepatic Treg recruitment is essentially mediated by human hepatocytes which are the principal target cells of HCV infection²⁹.

Our study provides strong evidence that the HCV infectious particles have the potential to shape the immune response by driving intra-hepatic Treg migration, increasing their Treg regulatory phenotype and suppressive function and finally inducing Treg expansion. This may explain how HCV escapes from the immune response.

Acknowledgments: This work received the financial support from the “Institut Pasteur de Lille” and the Nord-Pas-de Calais Region. This work was also supported by SIRIC ONCOLille; Biology Institute of Lille (IBL); Univ. Lille ; Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites (ANRS), La

ligue contre le cancer, Fondation ARC pour la recherche sur le cancer and Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF). We thank Pr. S. Dharancy, Pr E. Boleslawski and Pr. M. Salzet for useful discussions.

Conflict of interest. *None declared.*

REFERENCES

1. Hadigan C, Kottlilil S. Hepatitis C virus infection and coinfection with human immunodeficiency virus: challenges and advancements in management. *Jama* 2015 2011;306:294-301.
2. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-32.
3. Dhumeaux. Prise en charge des personnes infectées par les virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C. Rapport de recommandations 2014. ANRS/AFEF/Ministère des affaires sociales et de la santé 2014.
4. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6547-9.
5. Neumann-Haefelin C, Thimme R. Success and failure of virus-specific T cell responses in hepatitis C virus infection. *Dig Dis* 2011;29:416-22.
6. Everson GT, Terrault NA, Lok AS, Rodrigo del R, Brown RS, Jr., Saab S, Shiffman ML, Al-Osaimi AM, Kulik LM, Gillespie BW, Everhart JE. A randomized controlled trial of pretransplant antiviral therapy to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 2013;57:1752-62.
7. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453-63.
8. Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 1998;72:3827-36.
9. Ding Q, von Schaewen M, Ploss A. The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism. *Cell Host Microbe* 2014;16:562-8.
10. Doumba PP, Serti E, Boutsikou M, Konstadoulakis MM, Georgopoulou U, Koskinas J. Phenotypic and functional alterations of primary human PBMCs induced by HCV non-enveloped capsid-like particles uptake. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:3463-74.
11. Sarhan MA, Chen AY, Michalak TI. Differential expression of candidate virus receptors in human T lymphocytes prone or resistant to infection with patient-derived hepatitis C virus. *PLoS One* 2013;8:e62159.
12. Pape GR, Gerlach TJ, Diepolder HM, Gruner N, Jung M, Santantonio T. Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 1999;6 Suppl 1:36-40.
13. Houldsworth A, Metzner M, Hodgkinson A, Shaw S, Kaminski E, Demaine AG, Cramp ME. Haplotype analysis finds linkage disequilibrium in the IL-12 gene in patients with HCV. *J Med Virol* 2015;87:1207-17.
14. Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996;24:759-65.
15. Ouaguia L, Mrizak D, Renaud S, Morales O, Delhem N. Control of the inflammatory response mechanisms mediated by natural and induced regulatory T-cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-associated cancers. *Mediators Inflamm* 2014;2014:564296.
16. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 2007;37 Suppl 1:S116-23.

17. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
18. Wang H, Liu H, Su W, Zhang Y, Feng Y, Lu Y. [Relationship between CD4(+)/CD25(High)CD127(low) regularly T cells in the peripheral blood and tumor regression after neoadjuvant therapy in patients with rectal cancer]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2015;18:361-4.
19. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8:523-32.
20. Delhem N, Cottrez F, Carpentier A, Miroux C, Morales O, Francois V, Groux H, Auriault C, Pancre V. [Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression]. *Bull Cancer* 2008;95:1029-38.
21. Delhem N, Carpentier A, Morales O, Miroux C, Groux H, Auriault C, Pancre V. [Regulatory T-cells and hepatocellular carcinoma: implication of the regulatory T lymphocytes in the control of the immune response]. *Bull Cancer* 2008;95:1219-25.
22. Krishnadas DK, Ahn JS, Han J, Kumar R, Agrawal B. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms. *Int Immunol* 2010;22:491-502.
23. Carpentier A, Conti F, Stenard F, Aoudjehane L, Miroux C, Podevin P, Morales O, Chouzenoux S, Scatton O, Groux H, Auriault C, Calmus Y, Pancre V, Delhem N. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 2009;9:2102-12.
24. Langhans B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Satoguina J, Layland LE, Vidovic N, Hoerauf A, Oldenburg J, Sauerbruch T, Spengler U. Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. *Clin Sci (Lond)* 2010;119:97-109.
25. Miroux C, Vausselin T, Delhem N. Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10:1563-72.
26. Fabien S, Olivier M, Khaldoun G, Vivian V, Lynda A, Laurissa O, Gautier G, Yvon C, Nadira D, Filomena C. CD49b, a major marker of regulatory T-cells type 1, predicts the response to antiviral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Biomed Res Int* 2013;2014:290878.
27. Ouaguia L, Morales O, Mrizak D, Ghazal K, Boleslawski E, Auriault C, Pancre V, de Launoit Y, Conti F, Delhem N. Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *ISRN Hepatology* 2013;2013:564296.
28. Riezu-Boj JI, Larrea E, Aldabe R, Guembe L, Casares N, Galeano E, Echeverria I, Sarobe P, Herrero I, Sangro B, Prieto J, Lasarte JJ. Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection. *J Hepatol* 2011;54:422-31.
29. Podevin P, Carpentier A, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, Hernandez C, Calle V, Meritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 2010;139:1355-64.
30. Aoudjehane L, Bisch G, Scatton O, Granier C, Gaston J, Housset C, Roingeard P, Cosset FL, Perdigao F, Ballardur P, Wakita T, Calmus Y, Conti F. Infection of Human Liver Myofibroblasts by Hepatitis C Virus: A Direct Mechanism of Liver Fibrosis in Hepatitis C. *PLoS One* 2015;10:e0134141.
31. Aoudjehane L, Pissaia A, Jr., Scatton O, Podevin P, Massault PP, Chouzenoux S, Soubrane O, Calmus Y, Conti F. Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest* 2008;88:973-85.
32. Roque-Cuellar MC, Sanchez B, Garcia-Lozano JR, Garrido-Serrano A, Sayago M, Praena-Fernandez JM, Nunez-Roldan A, Aguilar-Reina J. Expression of CD81, SR-BI and LDLR in lymphocytes and monocytes from patients with classic and occult hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2012;84:1727-36.
33. Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Shimotohno K, Sakamoto N, Aly HH. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy. *Viral Immunol* 2014;27:285-94.
34. Jin X, Lu Y, Zhao Y, Yi S. Large-scale in vitro expansion of human regulatory T cells with potent xenoantigen-specific suppression. *Cytotechnology* 2015.

35. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-6.
36. Rajalakshmy AR, Malathi J, Madhavan HN. Hepatitis C Virus NS3 Mediated Microglial Inflammation via TLR2/TLR6 MyD88/NF-kappaB Pathway and Toll Like Receptor Ligand Treatment Furnished Immune Tolerance. *PLoS One* 2015;10:e0125419.
37. Sarhan MA, Pham TN, Chen AY, Michalak TI. Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. *J Virol* 2012;86:3723-35.
38. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623-6.
39. Serti E, Doumba PP, Thyphronitis G, Tsitoura P, Katsarou K, Foka P, Konstandoulakis MM, Koskinas J, Mavromara P, Georgopoulou U. Modulation of IL-2 expression after uptake of hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles: the role of p38 kinase. *Cell Mol Life Sci* 2012;68:505-22.
40. Yoshizawa K, Abe H, Kubo Y, Kitahara T, Aizawa R, Matsuoka M, Aizawa Y. Expansion of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2010;40:179-87.
41. Hougardy JM, Verscheure V, Locht C, Mascart F. In vitro expansion of CD4+CD25highFOXP3+CD127low/- regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy Mycobacterium tuberculosis-infected humans. *Microbes Infect* 2007;9:1325-32.
42. Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 2002;16:23-35.
43. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
44. Klein S, Kretz CC, Krammer PH, Kuhn A. CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2010;130:492-9.
45. Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2013;13:461-7.
46. Lin SJ, Lu CH, Yan DC, Lee PT, Hsiao HS, Kuo ML. Expansion of regulatory T cells from umbilical cord blood and adult peripheral blood CD4(+)CD25 (+) T cells. *Immunol Res* 2014;60:105-11.
47. Foster RG, Golden-Mason L, Rutebemberwa A, Rosen HR. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. *Dig Dis Sci* 2012;57:381-9.
48. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, Hafler DA. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 2009;113:4240-9.
49. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11:119-30.
50. Sakai Y, Yamanouchi K, Ohashi K, Koike M, Utoh R, Hasegawa H, Muraoka I, Suematsu T, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S. Vascularized subcutaneous human liver tissue from engineered hepatocyte/fibroblast sheets in mice. *Biomaterials* 2015 65:66-75.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Treg cell possess the classical HCV entry receptors: CD81, CLDN1 and LDLR. Gene expression analyses (Q-PCR) of receptors associated with HCV entry in host cells (**A**). Results are expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) and presented as means of 4 independent experiments \pm standard error of the mean

(SEM) bars. Protein expression (FACS) of receptors related to HCV entry **(B)**. Results are expressed in histograms displaying the percentage of cells positive for protein labeling compared to isotype control. Protein expression (IF) of receptors associated with HCV entry **(C)**. Protein expression (WB) of receptors linked to HCV entry **(D)**. Analyses were performed on Huh7 (control), PBMC and Tregs. The images are representative of at least 4 independent experiments.

Figure 2. HCV viral proteins E1, E2, Core and NS5A can be detected within Tregs. Huh7 and Tregs were cultured in the presence or in the absence of cell cultured HCV particles (HCV). Tregs were handled in activated condition in the presence of plate-bound anti-human CD3 mAb (1 μ g/mL) and soluble mouse anti-human CD28 mAb (100ng/mL). 72h later, cells were either fixed or analyzed by IF **(A)** or lysed and analyzed by WB **(B)**. Analyses were performed on both Huh7 infected (positive control) or not (negative control) and Tregs. For each IF experiment, the corresponding control is on the *upper-left quadrant*. The images presented are representative of at least 4 independent experiments.

Figure 3. HCV inoculation increases the suppressive phenotype of Tregs. HCV inoculation affects CD4, CD25, CD127, FOXP3, CTLA4 and LAG3 expression in activated Tregs at 3 hours post HCV inoculation (3Hp.i) **(A)** and 24H p.i **(B)**. Results are presented as means of 4 independent experiments of inoculated Tregs (*light grey bars*) versus non-inoculated Tregs (*dark bars*). Gene expressions are normalized by using GAPDH, β -actin, 18s and HRPT mRNA as housekeeping-genes and result are expressed in fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm SEM bars. **(C)** Representative *dot plot* of double stained CD4+CD25^{high} and CD25^{high} CD127⁻ Tregs 0H post HCV inoculation (0H p.i), 3H p.i and 24H p.i. **(D)** Percentage expression (%) of CD4+CD25^{high} and CD25^{high}CD127⁻ Treg phenotype subsets after HCV inoculation in 4 independent experiments after HCV inoculation at 3Hp.i and 24Hp.i.

Figure 4. HCV inoculation increases the *in vitro* proliferative capacity of Tregs. Treg cell proliferation was measured by using [³H]-thymidine incorporation assay and cell counting assays at 24H **(A)**, 48H **(B)** and 72H **(C)** after HCV inoculation. Results are expressed in index of proliferation of inoculated Tregs (*hatched column*) compared to non-inoculated (*light column*). Results are presented as mean values of triplicate \pm SEM bars of 4 independent experiments. Q-PCR analyses showed that HCV inoculation increases *IL-2*, *IL-4*,

BLIMP1, *BCL6* and *IL-15* gene expressions in Tregs at 3H p.i, **(D)** and 24H p.i **(E)**. Results are presented as means of 4 independent experiments in inoculated Tregs (*light grey bars*) versus non-inoculated Tregs (*dark bars*). Gene expressions are normalized by using GADPH, β -actin, 18s and HRPT mRNA as housekeeping-genes and result are expressed in fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm SEM bars. Secretion of the proliferative cytokine IL-2 by Tregs after HCV inoculation over time **(F)**. Results are expressed as mean of 3 independent experiment and presented in pg/mL \pm SEM bars comparing secretion by inoculated Tregs (*light grey bars*) versus non-inoculated Tregs (*dark bars*).

Figure 5. HCV inoculation increases the suppressive activity of Tregs. Tregs were pre-incubated for 24h with HCV before co-cultured with autologous PBMC at 2:1 ratio in activated conditions **(A)**. Results are expressed as mean values of triplicates of 3 independent experiments and presented in index of suppression \pm SEM bars. Mechanistic analyses highlight an increase expression of IL-2RA, IL-10, IL-24, IL-12p35, EB13, GZMB and TGF- β 1 mRNA in inoculated Tregs at 3Hp.i **(B)** and 24H p.i **(C)**. Results are presented as means of 4 independent experiments in inoculated Tregs (*light grey bars*) versus non inoculated Tregs (*dark bars*). Gene expressions are normalized by using GADPH, β -actin, 18s and HRPT mRNA as housekeeping-genes and result are expressed in fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm SEM bars. Secretion of immunosuppressive cytokine TGF- β 1 **(D)** and IL-10 **(F)** was evaluated at different time point after HCV inoculation on 3 independent experiments. Results are expressed in pg/mL \pm SEM bars comparing secretion by inoculated Tregs (*light grey bars*) versus non-inoculated Tregs (*dark bars*).

Figure 6. Tregs are recruited by infected primary human hepatocytes supernatants. Treg cell recruitment by primary human hepatocytes (PHH) was evaluated by Boyden chamber assay. *In vitro* infected PHHs recruit more natural Tregs than non-infected PHHs **(A)**. Results are expressed as mean values of quintuplicate of 6 independent experiments and presented in index of migration of Tregs \pm SEM bars. Q-PCR analyses show an increase of the expression of several chemokines associated with Treg recruitment such as CCL20 or CXCL16 by PHH **(B)**. Results are presented as means of 5 independent experiments on infected PHH (*light grey bars*) versus non-infected PHH (*dark bars*). HCV inoculation also increases the expression of corresponding chemokines receptors by isolated Tregs at 3H p.i and 24H p.i **(C)**. All gene

expressions are normalized by using GAPDH, β -actin, 18s and HRPT mRNA as housekeeping-genes and result are expressed in fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm SEM bars of 5 independent experiments. Secretion of 3 chemokines CCL20, CCL17 and CXCL16 has been examined by ELISA **(D, E, F)**. Results are expressed as mean of 4 independent experiments and presented in pg/mL \pm SEM bars comparing secretion by infected PHH (*light grey bars*) versus non-infected PHH (*dark bars*). The chemotactic potential of PHHs on CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} Tregs was investigated in Boyden chamber assay, using DMEM medium as negative control; h-rec-CCL20, h-rec-CCL17 and h-rec-CXCL16 as positive controls and PHH supernatant with specific blocking anti-chemokines **((D, E, F))**. Results are presented as means of quintuplicate of 4 independent experiments and presented in index of migration related to DMEM medium \pm SEM bars.

Figure 7. Tregs cannot be recruited by primary human intra-hepatic fibroblasts even upon HCV inoculation. Treg cell recruitment by *in vitro* inoculated primary human intra-hepatic fibroblast (IHF) was evaluated by Boyden chamber assay **(A)**. Results are expressed as mean values of quintuplicate of 2 independent experiments and presented in index of migration of Tregs \pm SEM bars. Secretion of chemokines CCL20, CCL17 and CXCL16 has been examined by ELISA **(B)**. Results are expressed as mean of 2 independent experiments and presented in pg/mL \pm SEM bars comparing secretion by inoculated IHF (*light grey bars*) versus non-inoculated IHF (*dark bars*).

Table I : Primer Sequences

Genes		primer sequences		
hCD81	Forward	TGTATCTGGAGCTGGGAGACAAG	Reverse	CCAGGAAGCCAACGAACATC
hSCARB1	Forward	ATGGAACTTCTGGGCAAAG	Reverse	CTTCAAACACCCCTGACTCC
hCLDN1	Forward	GGTCAGGCTCTTTCATCGG	Reverse	GTTTGGATAGGGCCTTGGT
hLDLR	Forward	ACTGGTGTGAGAGACCACC	Reverse	CAAAGGAAGACGAGGAGCAC
hOCLN	Forward	GGCCTCTTAAAAGTCCACCTC	Reverse	CGAACATGCATCTCTCCACCA
hEGFR	Forward	AGCTCTTCGGGGAGCAGCGA	Reverse	ACTCGTGCCTTGCCAACTTTCT
hCD5	Forward	GAGCTCAATCATCTGCTACGGA	Reverse	TTGTCGTTGGAGGTGTTGTCTT
hTLR1	Forward	TGCTGCCAATTGCTCATTG	Reverse	TGCAGACTCTCAGTGTAAAGTCTTG
hTLR2	Forward	TTGTGACCGCAATGGTATCTG	Reverse	TGTTGGACAGGTCAAGGCTTT
hTLR3	Forward	CAAATTAAGAGTTTTCTCCAGGGTG	Reverse	ATTCGAATGCTTGTGTTTGTCT
hTLR4	Forward	CCCACAACCTCCCTTCT	Reverse	TGCCCATCTTCAATTGTCTG
hTLR5	Forward	ACATGGTGTGGAGATACTAGATGTT	Reverse	TGGTGGGCAAGAATCAAAGAG
hTLR6	Forward	CCCTGCCATCTGTAAGGAA	Reverse	AGTGAGCAATTGGCAGCAAA
hTLR7	Forward	TGGAAATTGCCCTCGTTGTT	Reverse	CTGTCAGCGCATCAAAGCAT
hTLR8	Forward	GCCAAGCTCCCTACGCAAA	Reverse	CAAGGCACGCATGGAAATG
hTLR9	Forward	CTAACACAGTGCAGCAAGCT	Reverse	CTCATCGAGTGAGCGGAAGAA
hCD4	Forward	GGGAAATCAGGGCTCCTTCTTA	Reverse	TGGTCCCAAAGGCTTCTTCTT
hCD25 (IL2RA)	Forward	GGGACTGCTCACGTTTCA	Reverse	TTCAACATGGTTCCTTCTTGTAG
hCD127	Forward	GCAAGATACGTTTCTCAGCAAC	Reverse	TCCAAAGCTTTCTGGAGTGATGA
hFOXP3	Forward	TCACCTACGCCACGGTCA	Reverse	CACAAAGCACTTGTGCAG
hCTLAT4	Forward	TTCTTCTTTCATCCCTGTCTTCT	Reverse	GAGATGCATACTCACACACAAAGCT
hLAG3	Forward	TGGCTTCAACGTCTCCATCA	Reverse	CCCACCCTGGAACCTGCT
hIL2	Forward	ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTAC	Reverse	TCCAGAGTTTGAGTTCCTTCTTAGA
hIL4	Forward	CACAAGCAGCTGATCCGATTC	Reverse	TTCCAAGAAGTTTTCCAACGTACTC
hBLIMP1	Forward	GACGGGGTACTTCTGTTC	Reverse	GGCATTCTGGGAACTGTGT
hBCL6	Forward	CTGCAGATGGAGCATGTTGT	Reverse	CACCCGGGAGTATTCTCAG
hIL15	Forward	TTCCATCCAGTGCTACTTGTGTT	Reverse	CATTCACCCAGTTGGCTTCTGT
hIL10	Forward	GAGAACCAAGACCCAGACATCAA	Reverse	CCACGCCTTGCTCTTGT
hIL24	Forward	AAGCCTTCTGGGCTGTGAAA	Reverse	TGTGGACAAGGTAACAGCTCTCA
hIL12A (IL12p35)	Forward	CCTTCACTCCCAAAACCT	Reverse	TGGTAAACAGGCCTCCACTGT
hEBI3	Forward	CCCCGCCACTGCCACAATGA	Reverse	GCCCTCCAACAGGTGTCCCG
hGZMB	Forward	CGCCCCTACATGGCTTATCTT	Reverse	CCCCAAGGTGACATTTATGG
hTGFB1	Forward	CGAGCCTGAGGCCGACTAC	Reverse	CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA
hIL1R	Forward	CCACAAGGCCTGTGATTGTG	Reverse	TCAACTGGCCGGTGACATTA
hIL6	Forward	ATGTAGCCGCCACACA	Reverse	CCAGTGCTCTTTGCTGCTT
hIL12(IL12p40)	Forward	CTTCTAAGATGCGAGGCCAAG	Reverse	AGAGGTGTAGCACTCCGCAC
hIL17	Forward	TCCTGGGAAGACCTATTGG	Reverse	AGAATTTGGGCATCCTGGATT
hIL21	Forward	GATCGCCACATGATTAGAATGC	Reverse	AGGAAAAAGCTGACCACTCACAGT
hIL23	Forward	GTGGGACACATGGATCTAAGAGAA	Reverse	AAATCAGACCCTGGTGGATCCT
hIFN γ	Forward	ATGTAGCGGATAATGGAATCTC	Reverse	GACATTCAAGTCAAGTACC
hTNF α	Forward	ATCTTCTCGAACCCGAGTGA	Reverse	GGAGCTGCCCTCAGCTT

hCCL2	Forward	GTCATAGCAGCCACCTTCATT	Reverse	ACTTGCTGCTGGTGATTCTTCTATA
hCCL3	Forward	ATGGCTCTCTGCAACCAGTTCT	Reverse	CGTCTCAAAGTAGTCAGCTATGAAATTC
hCCL 4	Forward	GACTGTCCTGTCTCCTCATGCTA	Reverse	AAGCTTCTCGCGGTGTAAGA
hCCL7	Forward	ATGGCTCTCTGCAACCAGTTGT	Reverse	CGTCTCAAAGTAGTCAGCTATGA
hCCL17	Forward	GGGCTTCTCTGCAGCACATC	Reverse	GGTACCACGTCTTCAGCTTTCTAA
hCCL20	Forward	GGGCTTCTCTGGCTGCTTTG	Reverse	GAATACGGTCTGTGTATCCAAGACA
hCCL22	Forward	TTGCTGTGGCGTTCAAG	Reverse	CAGACGGTAACGGACGTAATCAC
hCXCL9	Forward	GGCATCATCTTGCTGGTTCTG	Reverse	GGTGGATAGTCCCTTGTTGGT
hCXCL11	Forward	TTGGCTGTGATATTGTGTGCTACA	Reverse	TGCCACTTTCCTGCTTTTACC
hCXCL16	Forward	ACACGAGGTTCCAGTCTCTTT	Reverse	CAATCCCCGAGTAAGCATGTC
hCCR2	Forward	GATCTGCTTTTTCTTACTCTCCA	Reverse	TCCGCCAAAATAACCGATGT
hCCR3	Forward	GGTACCACATCCTACTATGATGACGT	Reverse	CCACAGTGAACACCAGGGAGT
hCCR4	Forward	CCACCCTCGATGAAAGCATATAC	Reverse	TGCCTTGATGCCTTCTTTGG
hCCR5	Forward	GTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATT	Reverse	CGGGCTGCGATTTGCTT
hCCR6	Forward	GTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATT	Reverse	-CGGGCTGCGATTTGCTT
hCXCR3	Forward	TCTTCTATGACTATGGAGAAAACGA	Reverse	CGGTCCAAGTTCAGGCTGAA
hCXCR4	Forward	TCATGGGTTACCAGAAGAACTGA	Reverse	GAAGTTCCCAAAGTACCAGTTTGC
hCXCR6	Forward	ACTATGGGTTACGAGTTTCAATG	Reverse	CAGGTACATGCAGGGCAGAA
h β -actine	Forward	CACGGCATCGTACCAACT	Reverse	GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC
hGAPDH	Forward	GCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGG	Reverse	GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC
hHRPT	Forward	CCCTGGCGTCGTGATTAG	Reverse	ATGGCCTCCCATCTCCTT
hUBI	Forward	CCGACCACAGTGGCTATGC	Reverse	CCTCTTTAATATCTCCAGGCTTGA
h18S	Forward	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	Reverse	GGACATCTAAGGGCATCACA

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Flow Cytometry Analysis

Immune cell phenotypes were analyzed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer powered by CellQuest Pro software (Becton Dickinson, USA). The harvested cells (1.10^5) were washed with PBS and labeled with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs). For the detection of cell surface human immune-antigens, samples were incubated 15 min, in the dark and at room temperature with the following antibodies: Mouse anti-human CD4-phycoerythrin(PE)-cyanin(Cy)5 (BD Pharmingen, USA), Mouse anti-human CD25-PE (Miltenyi Biotec, Germany) and Mouse anti-human CD127-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Clinisciences, France), according to the manufacturer's instructions.

For the detection of the cell surface HCV-protein receptors, we proceed through indirect staining. Cells were first stained with diluted primary monoclonal or polyclonal antibodies, 40 min at room temperature. The antibodies used were: polyclonal rabbit anti-CD81 (5A6) (provided by Shoshana Levy, Stanford university, USA); polyclonal rabbit anti-Claudine-1 (Invitrogen, USA); monoclonal mouse anti-Occludine (Life Technologies, France); monoclonal Rabbit anti-SR-BI (Abcam, France); monoclonal mouse anti-LDLR (Santa Cruz Biotechnology, USA) and monoclonal mouse anti-phospho-EGF Receptor (Cell Signaling Technology, USA). Secondly, specific secondary antibodies conjugated with fluorochromes were used for protein detection (anti-mouse-FITC or anti-rabbit-FITC) (Jackson ImmunoResearch, UK).

After inoculation, labeled cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Santa Cruz Biotechnology, USA) before flow cytometry analysis. For each assay, appropriate isotype control mAbs were used for marker settings and the non-labeled fractions were used as controls. The results obtained were analyzed under Flow Jo software (Tree Star Inc., USA). Results presented here are the most representative of 5 independent experiments.

Cell Activation and Proliferation Assays

Proliferation assays were set up with 1.10^5 PBMC or 5.10^4 Treg in round bottom 96-well plates (Nunc, Denmark) and cultured for 48 hours in RPMI-1640 medium (Invitrogen, France) supplemented with 0.02mM L-Glutamin, 0.02mM of sodium-pyruvate, 100U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin and 10% of human AB Serum (BioWest, France). Cells were previously activated with plate-bound anti-CD3 mAb (1µg/mL) (provided by A. Tscopoulos, France) incubated at 37°C 2 hours before the culture and soluble mouse anti-human CD28 mAb (100ng/mL) (Clinisciences, France) was added extemporaneously. Proliferation was measured after [methyl-3H]-thymidin (1 Ci/well; GE Healthcare, France) addition for the last 18 hours. After 48h of culture cells were harvested on glass fiber filter (Wallac, Finland) using Tomtec harvester (Wallac). The filter was then sealed in a sample bag after drying and addition of scintillation liquid (Beckman Coulter). Radioactive thymidine, incorporated into replicated cellular DNA by proliferative cells, was detected by scintillation counting using a 1450 Trilux β-counter (Wallac). Each proliferation assay was

carried out in triplicate and estimated in count per minute (cpm) and results were normalized compared with non-treated conditions. Results were expressed as proliferation index with mean values and standard error of at least 3 independent experiments.

Cell Suppression Assay (Mixed Leukocyte Reaction)

Suppressive activity of Treg was measured by their ability to inhibit the proliferative responses of activated autologous PBMC in mixed leukocyte reaction (MLR). Assays require a co-culture of $1 \cdot 10^5$ PBMC and $5 \cdot 10^4$ Tregs (ratio 2:1) in round bottom 96-well plates for 48 hours at 37°C $5\%\text{CO}_2$. Cells were activated with anti-CD3 mAb and anti-CD28 as previously described. Inhibition of PBMC proliferation induced by Treg was measured as described above. Tregs cultured with non-infected supernatant of Huh7 (non-inoculated) were used as control. Each assay was performed in triplicate and the results were expressed with mean values and standard error either in cpm or in Suppression index.

Cell Viability Assay

Treg viability and proliferation were also assessed by cell-counting measurement evolving Trypan Blue exclusion test. Briefly, $5 \cdot 10^4$ Tregs were cultured and activated in the same conditions as for the measurement of proliferation. After 24, 48 or 72 hours of culture, 1 volume of a vital azoic dye trypan blue solution 0.4% (Sigma Aldrich, USA) is added to 1 volume of cell suspension. After 3 minutes, the mixture is deposited on a Thomas (Watson, Japan) or KOVA slides (HYCOR BIOMEDICAL LTD, UK) for microscopy analysis. Counting was done in triplicate by at least two different persons and the results expressed as proliferation index.

Cell Lysis Assay

PBMC lysis was measured with the Kit CytoTox-Glo Assay (Promega, USA) according to the manufacturer instructions. Briefly, tests were carried out using co-culture of $1 \cdot 10^5$ PBMC and $5 \cdot 10^4$ autologous Tregs at different ratios (2:0.5; 2:1; 2:2). Culture and activation were done as described above. A first measurement of luminescence was made on LB960-luminometer (Centro-Berthold Technologies, France), and is proportional to the partial lysis of PBMC induced by Treg. Then PMBC total lysis induced by digitonin (Kit) resulted in a second measurement of luminescence. According to manufacturer's instruction, cytolysis was calculated by subtracting the background value from the mean value of the partial PBMC lysis and Cell viability was obtained by subtracting cytolysis from the mean value of total PBMC lysis. Finally, the percentage of PBMC lysis was given by the ratio Cell viability over mean value of total PBMC lysis with the subtraction of background value. Tests were performed in triplicate and results were expressed as percentage of PBMC lysis.

Immunofluorescence

Antibodies:

For the detection of HCV protein receptors on isolated cells, the primary antibodies used were the same as those used for flow cytometry. For the detection of HCV viral proteins within inoculated cells: we used the following primary monoclonal antibodies: Rat anti-E2 (3/11); Mouse anti-E1 (A4) (provided by J.Dubuisson team, France), Mouse anti-CORE (Thermo Scientific, USA) and Rabbit anti-NS5A (Abcam, France). The secondary Abs were the following: goat anti-rabbit Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit Alexa Fluor 555, goat anti-mouse Alexa Fluor 488, goat anti-mouse Alexa Fluor 555 (Life technologies, France) and Donkey Anti-Rat IgG CyTM3 (Jackson ImmunoResearch, UK).

Cell Labelling:

5.10⁵ Inoculated immune cells were fixed with 4%PFA before plated on slides by centrifugation (Cytospin 4 ThermoShandon, France). Infected Huh-7 cells, in contrary, were directly cultured on 12-mm glass cover slips before being fixed also. Cells were then permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS (Life Technologies, France). Both primary and secondary antibodies incubations were carried out in PBS containing 1% BSA, 2 hours at room temperature. For double-label immunofluorescence with primary antibodies from different species, different conjugated secondary antibodies were used. Nucleus was stained with 4'6'-diamidino-2-phenylindole (Sigma Aldrich, USA). Slide and blade assembly was done with Mowiol (Polysciences, Germany) and the slides were kept in the dark at 4°C. A witness not marked with primary Ab was done to eliminate background noise due to nonspecific bindings of secondary Ab. Infected Huh7 served as positive controls. Slide analyses were done under Zen software (Carl Zeiss, France) on either confocal microscopy LSM780 (Carl Zeiss) or AxioImager Z1 upright microscope (Carl Zeiss) equipped with an ApoTome unit for fluorescence image acquisitions.

Real-Time Quantitative PCR assays

RNA extraction from primary immune cells

PBMC and Tregs were incubated with HCVcc at different time point (3, 24 and 48 hours). The non-inoculated cells were used as negative controls. RNA extraction was performed using at least 7.10⁵ cells with the RNeasy Mini Plus Kit (QIAGEN, Germany) according to manufacturer's instructions. The cellular dry pellet was lysed in RLT Buffer supplemented with 1% β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich, USA). Genomic DNA and cell debris were discarded by adding 70% Ethanol (VWR PROLABO Chemicals, France) and total RNA was eluted using DNase-RNase-free distilled water (Invitrogen, USA).

RNA extraction from primary hepatic cells and cell lines :

RNA extraction from HH, HIF and Huh7 was performed using TrizolTM reagent (Invitrogen, USA) as described by the manufacturer. Briefly, 5.10⁵ cells were lysed in Trizol solution with 5min of incubation at room temperature. The separation of different liquid phases was achieved by adding Chloroform (PROLABO Merck Eurolab, France). Total RNA was then immunoprecipitate by adding isopropanol (ACROS Organics, USA). The RNA pellet was finally washed twice with 75% ethanol (CARLO ERBA Reagent, France) and dissolved in DNase-Rnase-free distilled water (Invitrogen).

Before reverse transcription, we performed a DNase treatment by using the kit Message clean (GenHunter Corp, France). RNA concentration, integrity and purity were measured by A260/280 spectrophotometry measurement on Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, France) and 1% agarose gel electrophoresis (Invitrogen, USA). Extracted RNAs were stored at -80°C until further use.

mRNA Reverse Transcription:

Synthesis of the complementary DNA (cDNA) was achieved using the Reverse Transcriptase kit Superscript™ II (Invitrogen, USA). 500ng to 2ug of total RNA were supplemented with 5μL of a master mix consisting of oligo dT (Roche Diagnostic, France), RNAsin (Promega, France) and DNase-Rnase-free distilled water (Invitrogen) followed by 10min of incubation at 70°C. After 5 minutes at room temperature, 10 μL of the following mix were added: dNTPs (Amersham Biosciences, UK), RNAsin, buffer 5X, dithiothreitol and Superscript II (Invitrogen, USA). The reaction was then followed by an initial incubation step of 1 hour at 45°C with a second incubation of 5 min at 95°C. Residual RNAs were removed with RNase H treatment (Promega, France) for 20 min at 37°C. Finally, ultrapure distilled water (Life Technologies, France) was added to obtain a cDNA final concentration of 10ng/μL stored at -20°C until further use.

Mx3005PTM Sequence Detection System:

Primers were specifically designed for the Q-PCR and allowed the amplification of the genes encoding a set of markers associated with Treg, PBMC, HH and FIH. The List of all primers is resumed in the *Table 1*. The results are normalized with 4 housekeeping genes (HKG): G3PDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase), HPRT (Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transferase), β-actin and Ubiquitin.

Transcripts were quantified using optical 96 well reaction plates (Eurogentec, Belgium) incubated in the Mx3005P™ sequence detection system (Agilent technologies, France). Q-PCR were performed with the kit MESAGREEN qPCR MasterMix PLUS for SYBR Assay (Eurogentec, Belgium) according to the manufacturer's instructions. Each reaction well contains: 10 μl of sense and and non-sense primers at 0.1μM, 9μL of 2X reaction buffer MESA GREEN and 1μL (12ng) of cDNA. The PCR program included initial denaturation and MeteorTaq activation for 5 min at 95°C, followed by 45 standard amplification cycles consisting of 15 sec at 95°C (denaturation) and 1 min at 60°C (annealing and elongation). The fluorescence intensity is measured at the end of each elongation cycle and a melting curve analysis was carried out immediately after amplification, in accordance with the manufacturer's instructions.

Data Expression:

Q-PCR reactions were used to quantify the gene expression modification of cell markers on immune and hepatic cells. The quantitative analysis was achieved by using the cycle threshold (C_T) value for each well calculated with MxPro Software. Each individual value was normalized by using the mean of the 4 HKG according to the standard ΔC_T method: $\Delta C_T = C_T - C_{THKG}$. The expression of each gene in inoculated group is then compared to its expression in the reference non-inoculated group leading to $\Delta\Delta C_T$. The fold change or quantitative relative gene expression was obtained by using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (Livak, et al., 2001).

Western Blot Analysis

Different cell subsets were incubated with HCVcc at different time point (24h, 48h and 72 hours). The non-inoculated cells were used as controls. After washing, cells were lysed 15 min on ice, in Protein Extraction Reagent Cytobuster buffer (Novagen EMD Chemicals, USA) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, USA) and Phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, USA). For Huh7, protein extraction was performed by using a RIPA buffer consisting of 0.5% Triton X100, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 10mM Tris H, 50mM PMSF and 50 μ M TPCK (Roche diagnostic, France) supplemented with protease inhibitors. Protein concentrations were measured using colorimetric Bio-Rad Protein Assay according to manufacturer's instructions (BioRad Laboratories, Germany) and the protein absorbance was read with Multiskan spectrophotometer (ThermoLabsystems, France) at 595 nm. Total cell extracts were then analyzed by Western blotting. Briefly, 30 μ g of total proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis using precast 4-12% gradient gels (Life technologies, France) in standard conditions except when planning detection of CD81, LDLR and E1 which require non-reducing conditions. Migration was performed in a MOPS SDS Running buffer (Life Technologies, USA), then proteins were transferred on nitrocellulose Hybond-C Extra membranes (Amersham Biosciences, UK) with a transfer buffer containing Tris-Gly 1X (Euromedex, France), Methanol (VWR Prolabo, France) and deionized water. The nitrocellulose membrane was saturated for 1 hour at room temperature in blocking buffer containing PBS, Tween 20 (BioSolve BV, France) and 5% Milk (Régilait, France). The membrane was incubated overnight at 4°C with the primary antibodies directed against CD81, Claudine1, SRBI, LDLR, Occludine, EGFR, E1, E2, CORE and NS5A. This was followed by 1 hour incubation at room temperature with peroxydase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rat or anti-rabbit, 1:10000) (GE Healthcare, USA). Specific protein signals were visualized by using Western Lightning Plus-Enhanced Chemiluminescence Substrate kit (PerkinElmer, USA) and detected in Luminescent Image Analyser LAS3000 (Fujifilm Global, USA).

Cytokine detection (SANDWICH ELISA)

Supernatants of all cell cultures were harvested and kept at -80°C for cytokine assays. Cytokine secretions of IL-10, TGF- β 1, IL-2, IL-17 and chemokines production of TARC, MIP3a and CXCL16 were determined by Sandwich ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) method. Briefly, purified primary antibodies were coated overnight at 4°C in flat bottom 96-well plates (NUNC, Danemark) before incubation with samples. The corresponding biotinylated antibodies were added for protein detection. The reaction was amplified with Streptavidine-peroxydase (Interchim, UK). Cytokines concentration was finally highlighted with the addition of OPD (Sigma-Aldrich, USA). After development, the plates were read in Multiskan spectrophotometer at 492 nm. The purified and biotinylated antibodies used were the following: Mouse anti-human IL-2, Rat anti-human IL-10, Mouse anti-human IL-17, Rat anti-human TGF- β 1 (BD PharmingenTM, USA), Rabbit anti-human CXCL16, Rabbit anti-human CCL17 (TARC) and Mouse anti-human

CCL20 (MIP-3a) (PeproTech, France). Results were expressed in pg/mL as the mean of duplicate wells after subtracting background values.

LEGEND OF SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1. Phenotypic and functional characterization of freshly isolated natural regulatory T cells.

Representative *dot plot* of triple stained CD4⁺CD25^{+/high}CD127^{-/low} Tregs after magnetic bead-isolation of 10 independent experiments **(A)**. Based on CD4 and CD25 protein expression, the number in the *upper-right quadrant* indicates the percentage of CD4⁺CD25^{high} Tregs which is superior to 95%. More than 94% of these freshly isolated Tregs are CD25^{high}CD127^{-/low} (*upper-left quadrant*). The suppressive activity of Tregs was addressed by using a model of lymphocyte reaction (MLR) by co-culture of autologous PBMC and Tregs at a 2:1 ratio in activated condition in the presence of plate-bound anti-human CD3 mAb (1µg/mL) and soluble mouse anti-human CD28 mAb (100ng/mL). Proliferation was measured using [³H]-thymidin incorporation assays during the last 18 hours and values were obtained as counts per minute (cpm). Assays were performed after 48h and results revealed that isolated Tregs possess immunosuppressive capacity and significantly decrease of PBMC proliferation for around 24% **(B)**. These representative results of 10 independent experiments are expressed as mean of cpm values of triplicate ± standard error of the mean (SEM) bars. The ability of Tregs to induce PBMC cells lysis was assessed by using a metabolic assay by co-culture of autologous PBMC and Tregs at 2:0, 2:1 and 2:2 ratios in activated condition **(C)**. PBMC lysis percentage was measured by luminescence and normalized with the plate background value. Assays were performed after 48h of PBMC culture with Tregs. Tests were performed in duplicate in 3 independent experiments and results were expressed as percentage of PBMC cell lysis ± SEM bars.

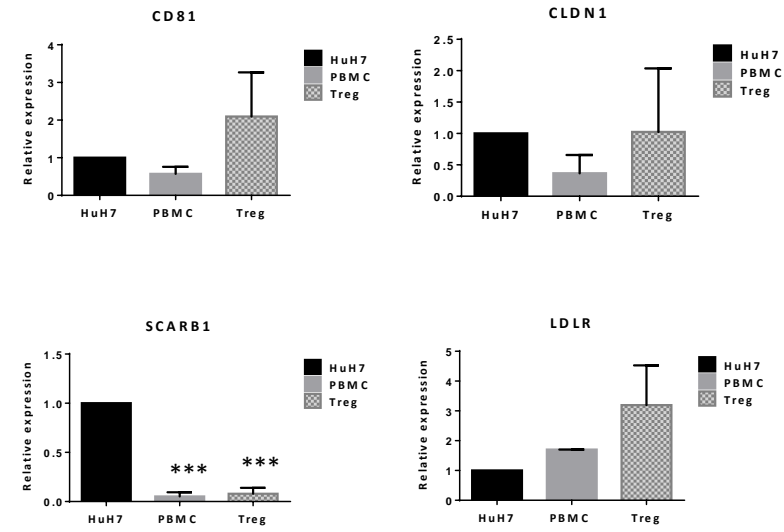
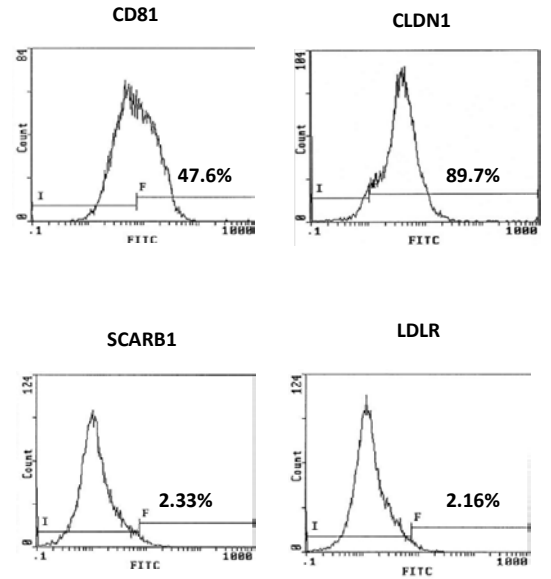
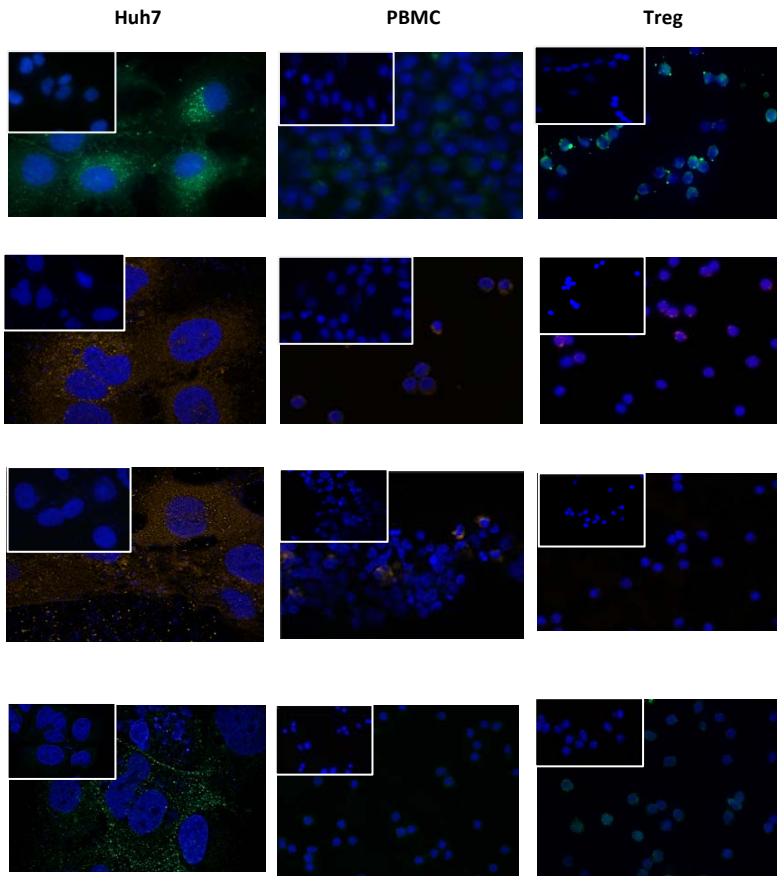
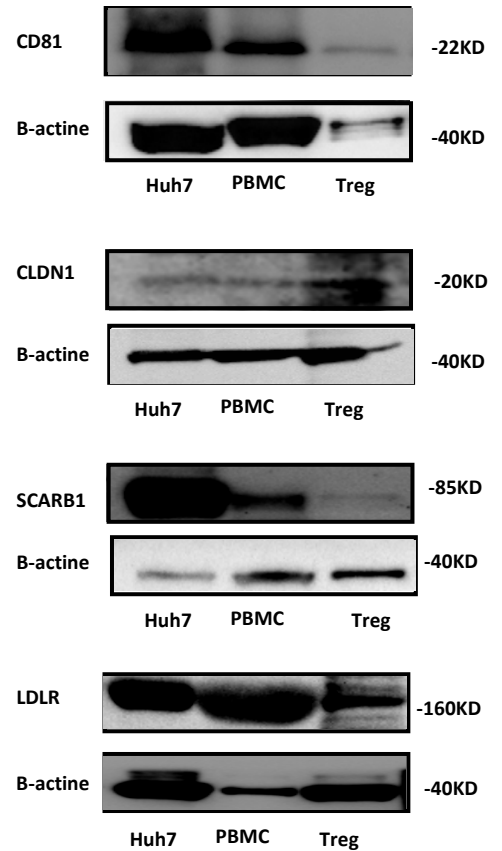
Figure S2. Treg cell possess the HCV entry coreceptors OCLN and EGFR.

Transcriptomic analyses of coreceptors OCLN and EGFR associated with HCV entry in host cells **(A)**. Results are expressed as means of 3 independent experiments and presented as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ± SEM bars. Gene expressions are normalized by using GADPH, β-actin, 18s and HRPT mRNA as housekeeping-gene before being reported to Huh7. Protein expression of OCLN and EGFR related to HCV entry was assessed by IF, FACS and WB **(B)**. These images are representative of at least 3 independent experiments.

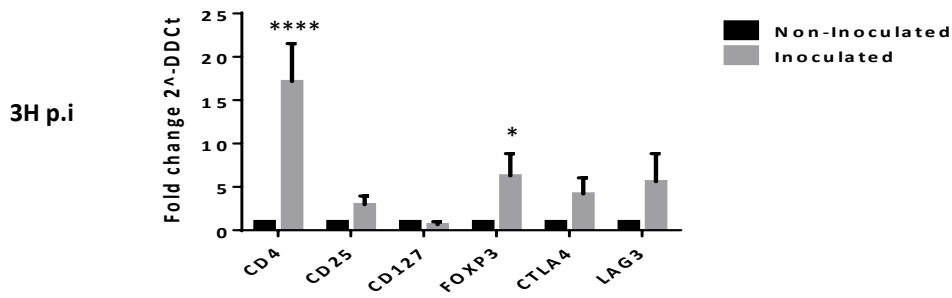
Figure S3. Impact of HCV inoculation on receptor and coreceptor gene expressions by Tregs. Tregs were handled in activated condition and were cultured in the presence or in the absence of HCVcc. 3H and 24H later, mRNA were extracted for transcriptomic analyses. Gene expressions of HCV receptor (*CD81*, *CLDN1*, *SCARB1*, *LDLR*, *EGFR*, *OCLN*, *CD5*) are expressed as means of 3 and 5 independent experiments (respectively 3H p.i and 24H p.i) (**A**, **B**). Gene expressions of entry coreceptors (*TLR1-9*) are expressed as means of 3 and 4 independent experiments (respectively 3H p.i and 24H p.i) (**C**, **D**). These gene expressions are normalized by using GADPH, β -actin, 18s and HRPT mRNA as housekeeping-gene before being reported to non-inoculated Tregs (*black bars*). Results are representative of presented as fold change ($2^{\Delta\Delta Ct}$) \pm SEM bars.

Figure S4. Impact of HCV inoculation on the frequency of suppressive Treg phenotype. FACS analyses were performed to evaluate the impact of HCV inoculation on the frequency of suppressive Tregs. CD4+CD25^{high} and CD25^{high}CD127⁻ T cells subsets were quantify between inoculated Tregs (*light grey bars*) vs non-inoculated Tregs (*black bars*) at both 3H p.i and 24H p.i (**A**, **B**). We also quantify these subsets between inoculated Tregs (*light grey bars*) vs freshly isolated cells (*black bars*) at both 3H p.i and 24H p.i (**C**, **D**). Results are expressed as means of percentage of the double stained population of 4 independent experiments \pm SEM bars.

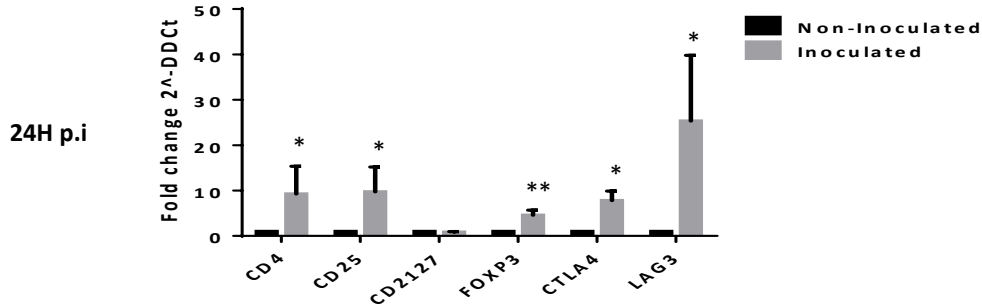
Figure S5. Impact of Tregs on the development of liver inflammation after HCV inoculation. Tregs were handled in activated condition and were cultured in the presence or in the absence of HCV particles. Gene expression of inflammatory factors *IL-1R*, *IL-6*, *IL-12*, *IL-16*, *IL-21*, *IL-23*, *TNF α* and *IFN γ* are expressed as means of 3 and 5 independent experiments (respectively 3H p.i and 24H p.i) (**A**, **B**). These gene expressions are normalized by using GADPH, β -actin, 18s and HPRT mRNA as housekeeping-gene before being reported to control and results are presented as fold change ($2^{\Delta\Delta Ct}$) \pm SEM bars comparing inoculated Tregs (*light grey bars*) versus non-inoculated Tregs (*dark bars*). Secretion of inflammatory cytokine IL-17 (**C**) and IFN γ (**D**) were investigated by ELISA assays. Results are expressed as mean of 3 independent experiment and presented in pg/mL \pm SEM bars comparing secretion by inoculated Tregs (*light grey bars*) versus non-inoculated Tregs (*dark bars*).

A**B****C****D****Figure 1**

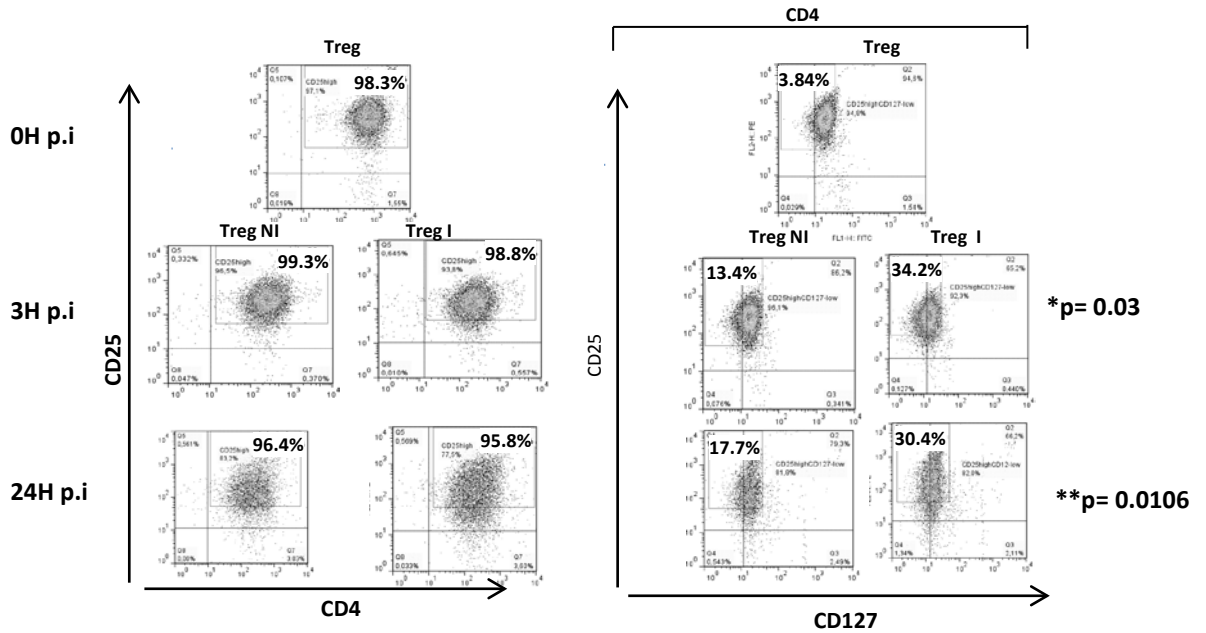
A



B



C



D

TREG CELL POPULATION		CD4+CD25 ^{high}			CD25 ^{high} CD127 ⁻		
		0h p.i.	3h p.i.	24h p.i.	0h p.i.	3h p.i. (*)	24h p.i. (**)
Sample 1	Non-Inoculated	98.3%	98.8%	95.9%	42.0%	44.1%	12.0%
	Inoculated	98.3%	98.0%	93.8%	42.0%	60.5%	17.0%
Sample 2	Non-Inoculated	96.6%	99.1%	82.8%	3.75%	8.64%	14.3%
	Inoculated	96.6%	98.4%	80.3%	3.75%	33.7%	49.1%
Sample 3	Non-Inoculated	98.30%	99.80%	97.10%	9.19%	9.01%	4.19%
	Inoculated	98.30%	98.90%	95.20%	9.19%	17.2%	16.20%
Sample 4	Non-Inoculated	98.30%	99.30%	96.40%	3.84%	13.40%	17.70%
	Inoculated	98.30%	98.80%	95.80%	3.84%	34.2%	30.40%

Figure 3

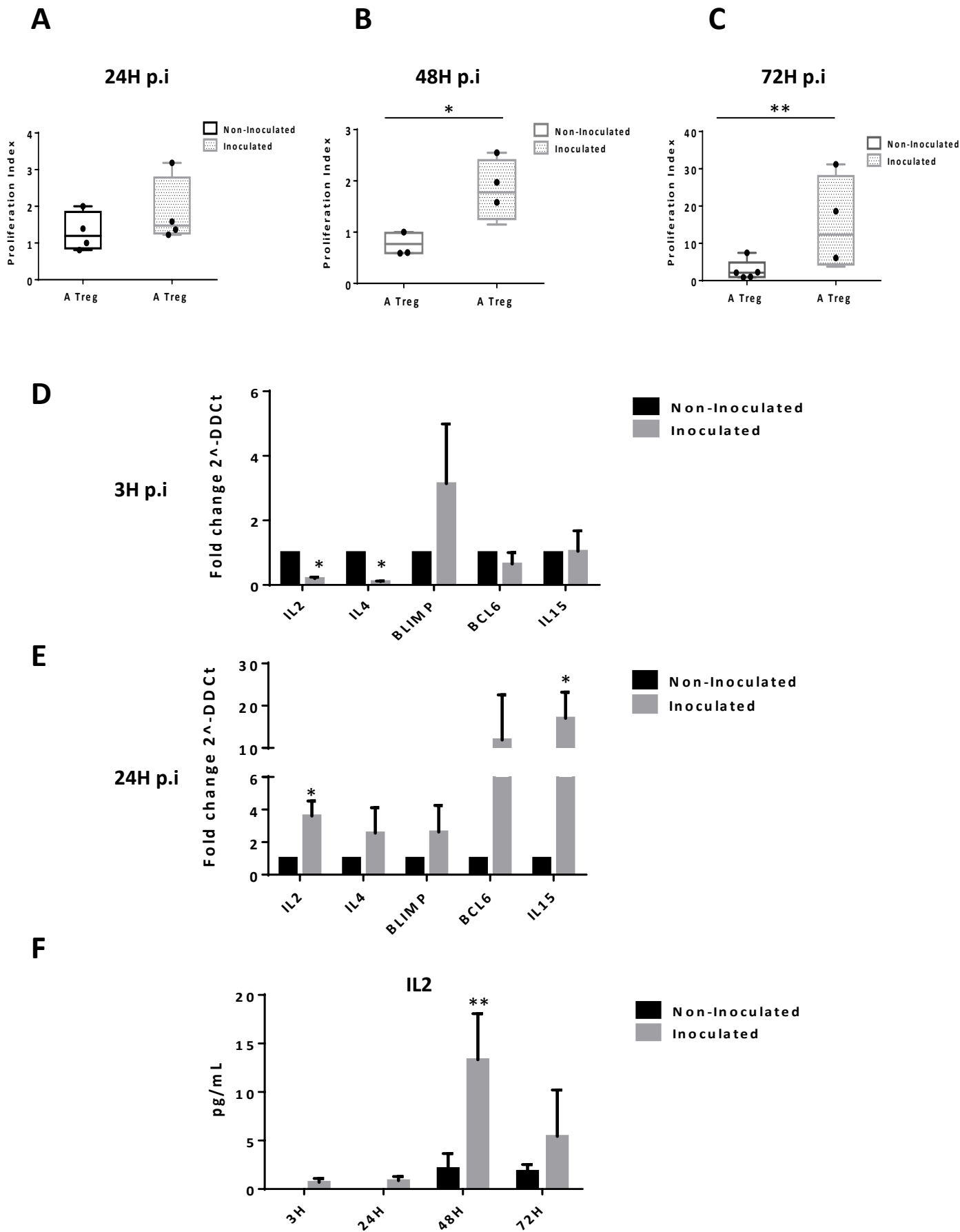
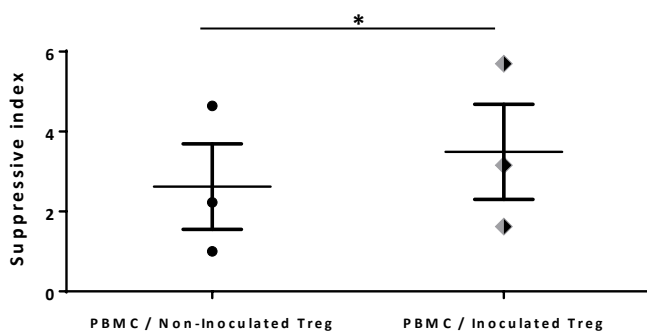
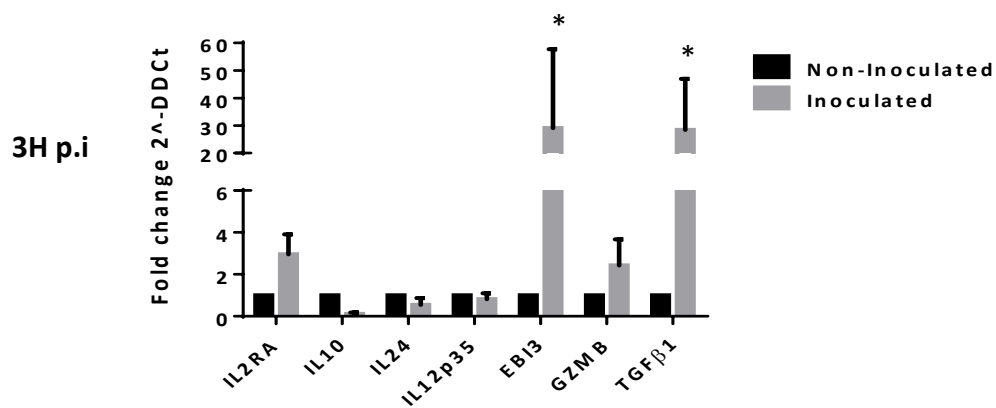
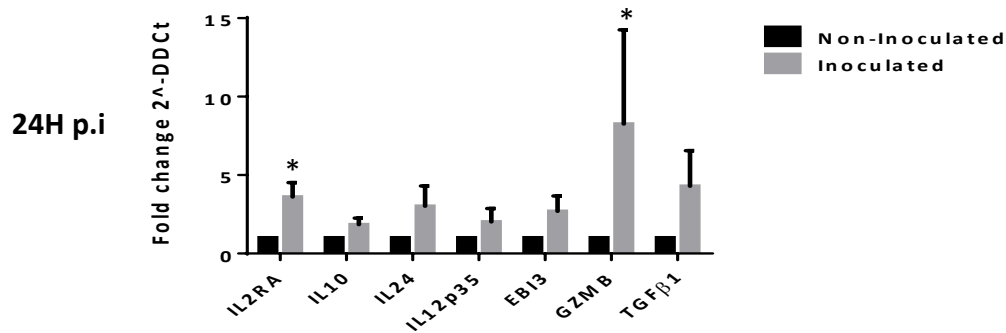
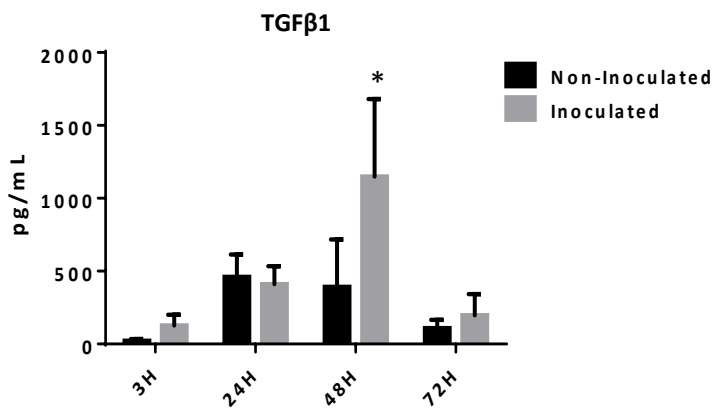
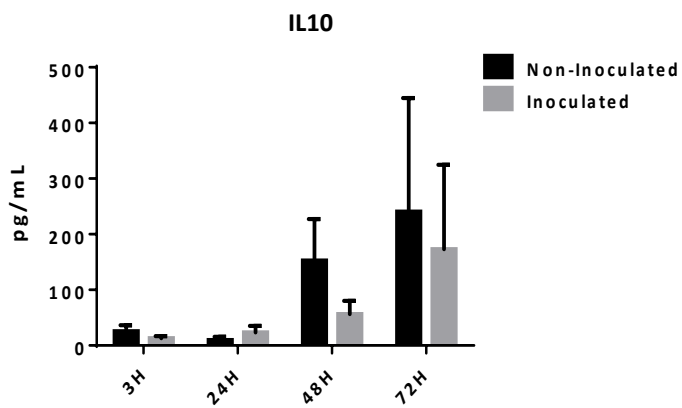
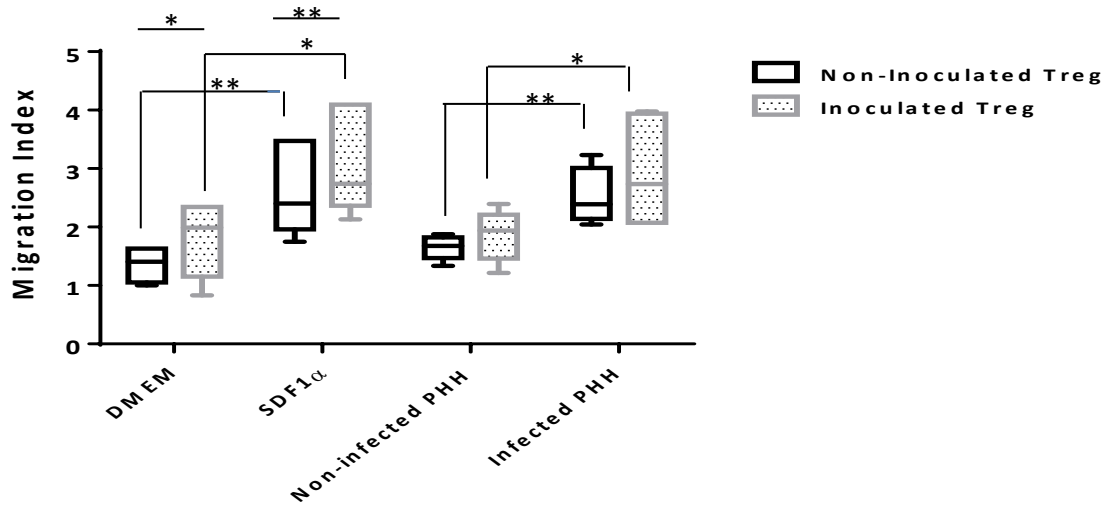
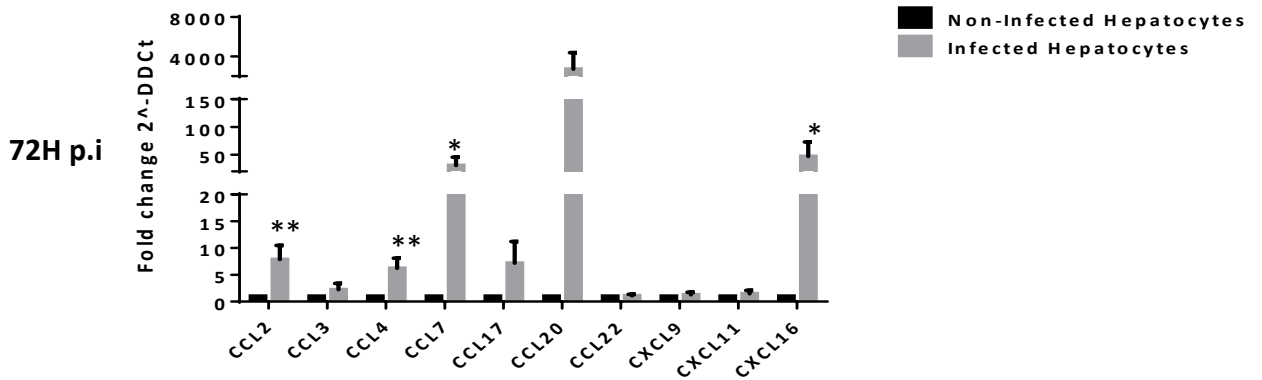
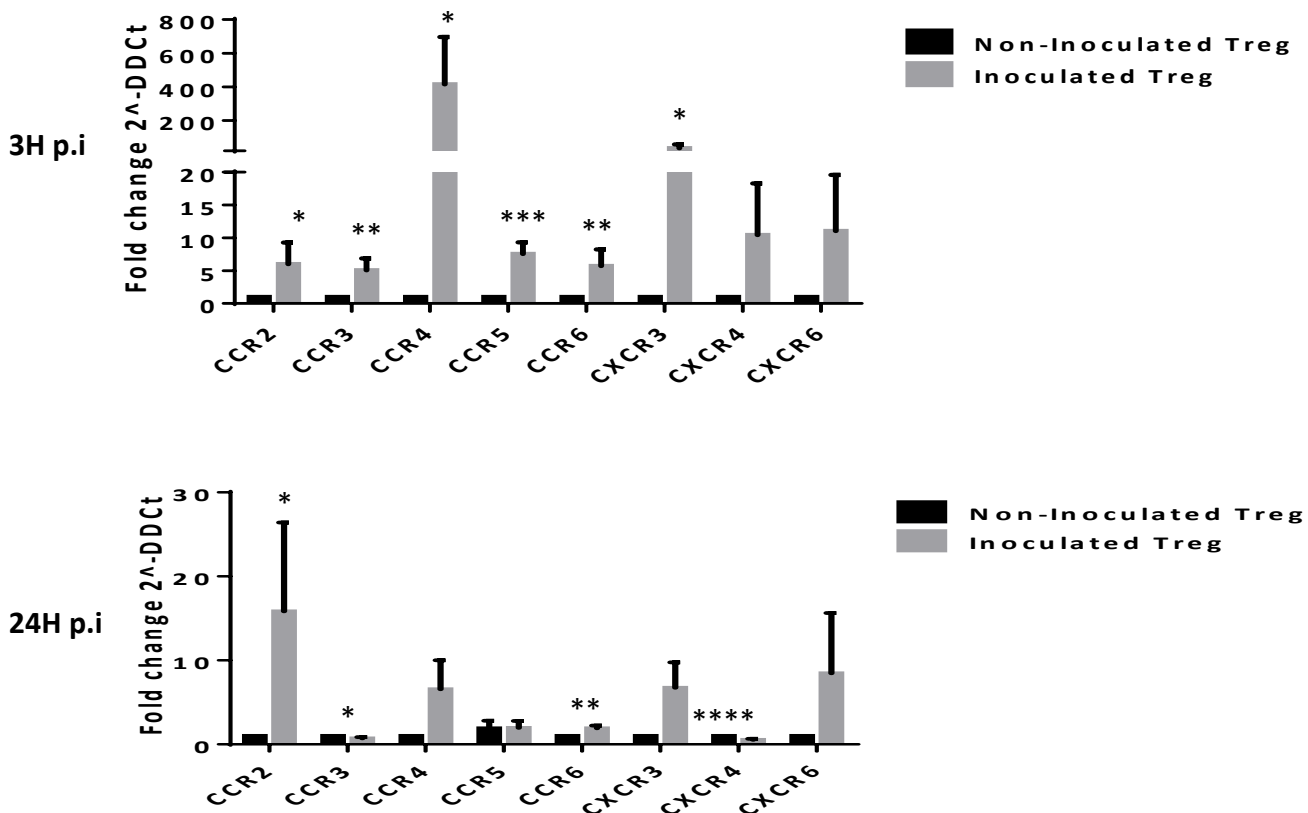
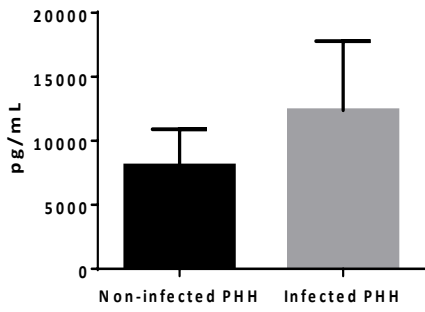


Figure 4

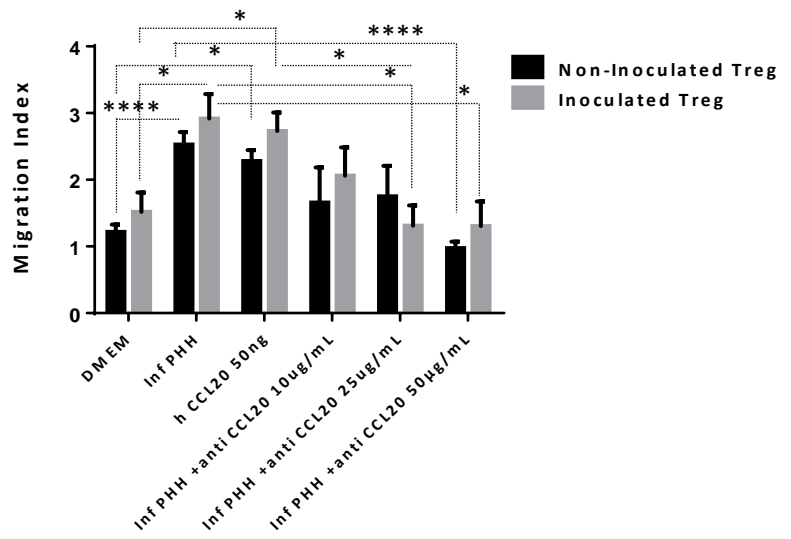
A**B****C****D****E****Figure 5**

A**B****C****Figure 6a**

D CCL20

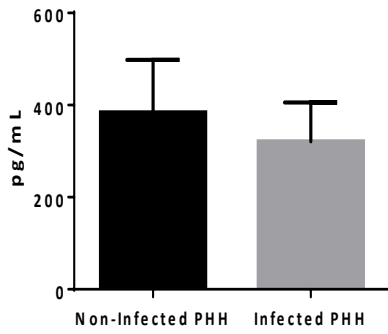


Anti-CCL20

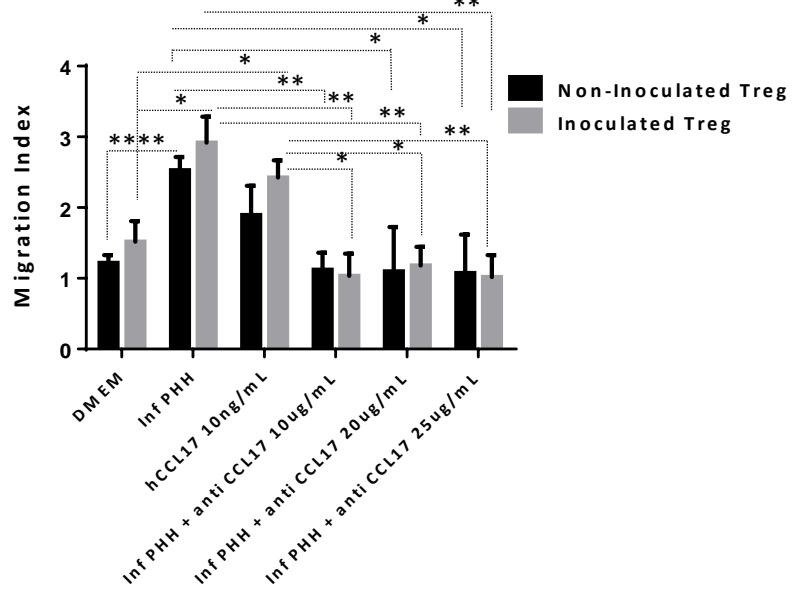


E

CCL17

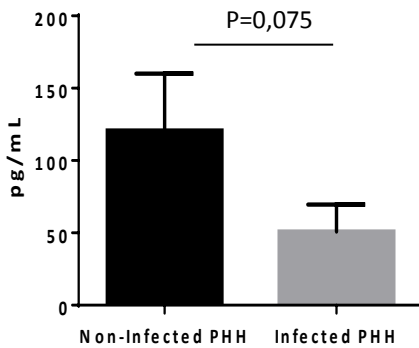


Anti-CCL17



F

CXCL16



Anti-CXCL16

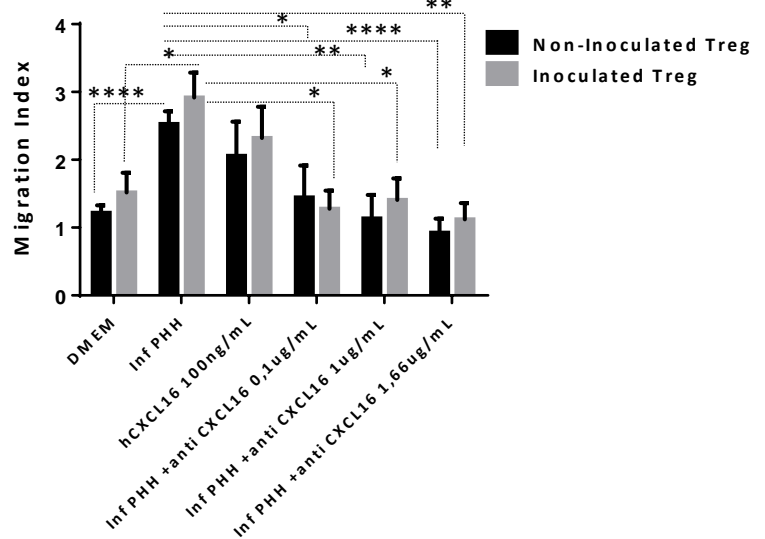
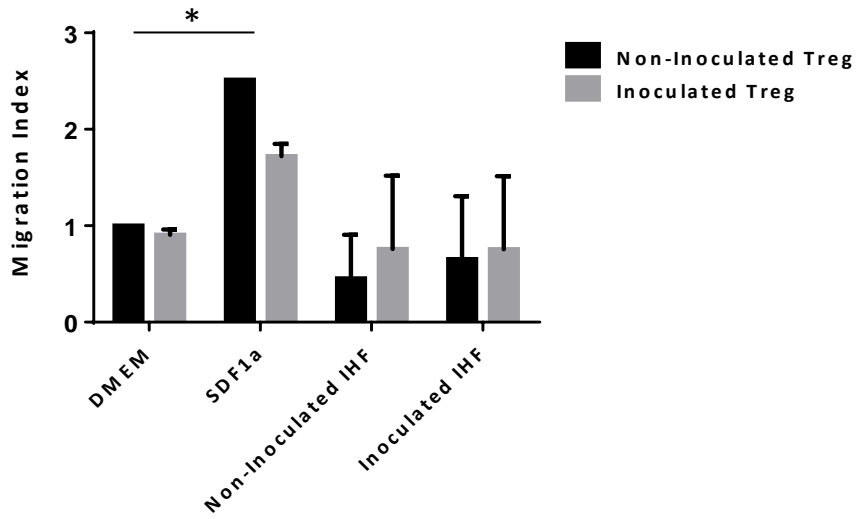
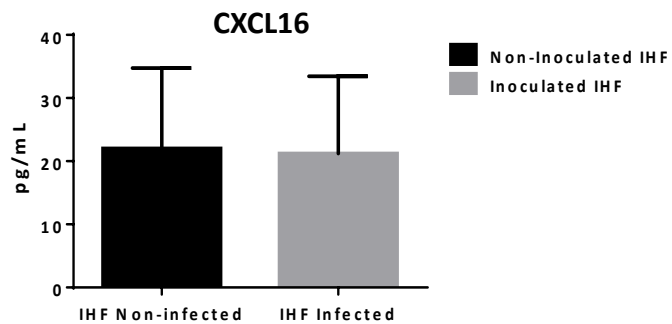
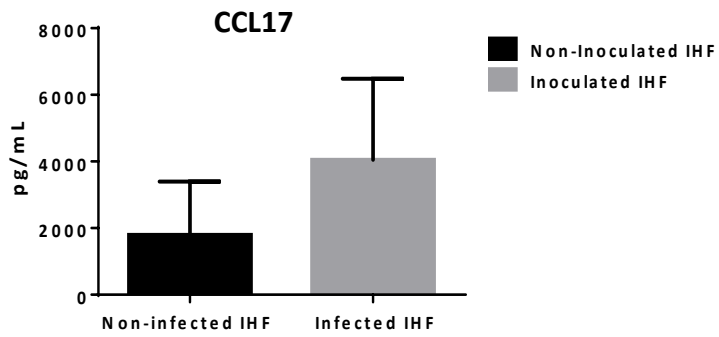
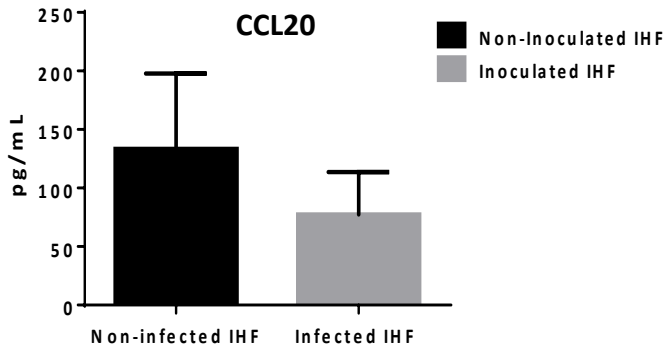
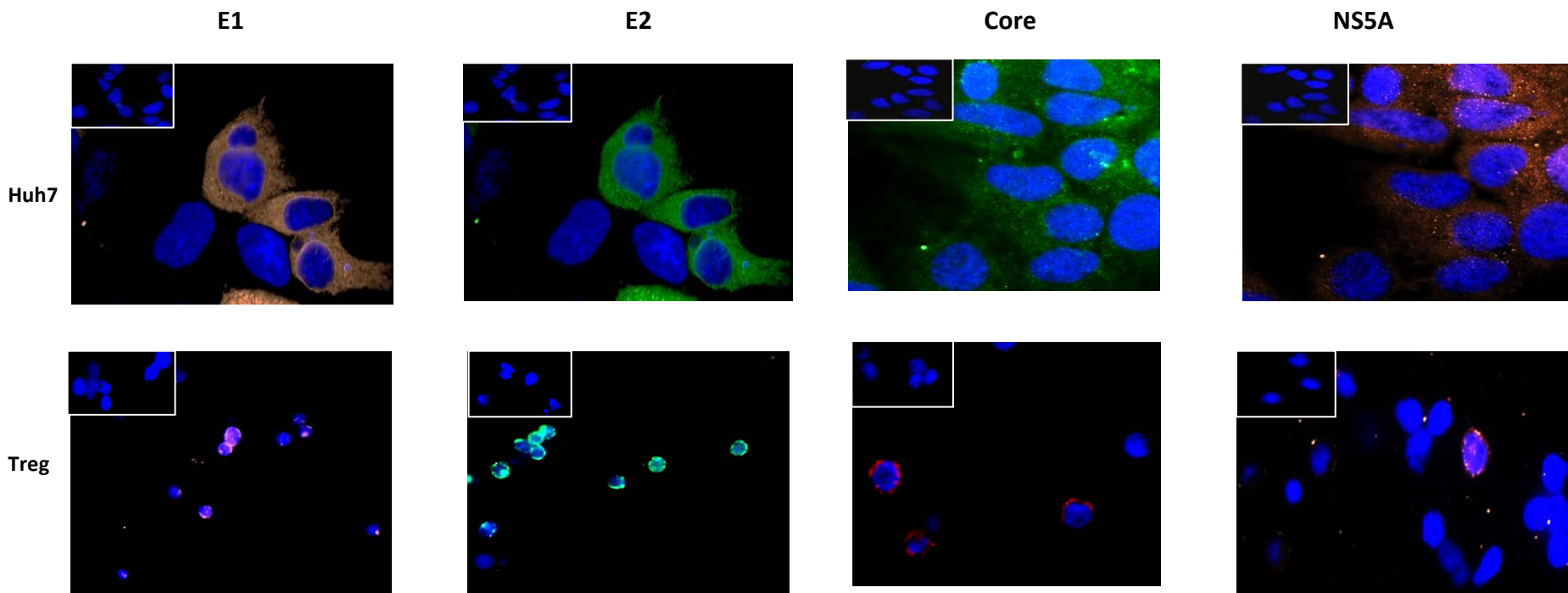
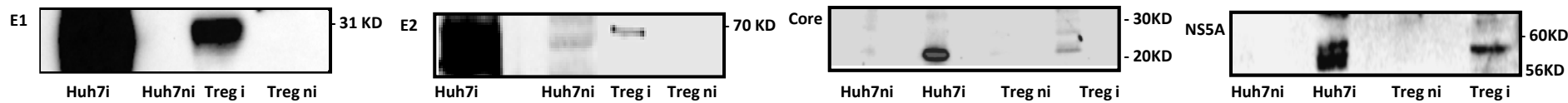
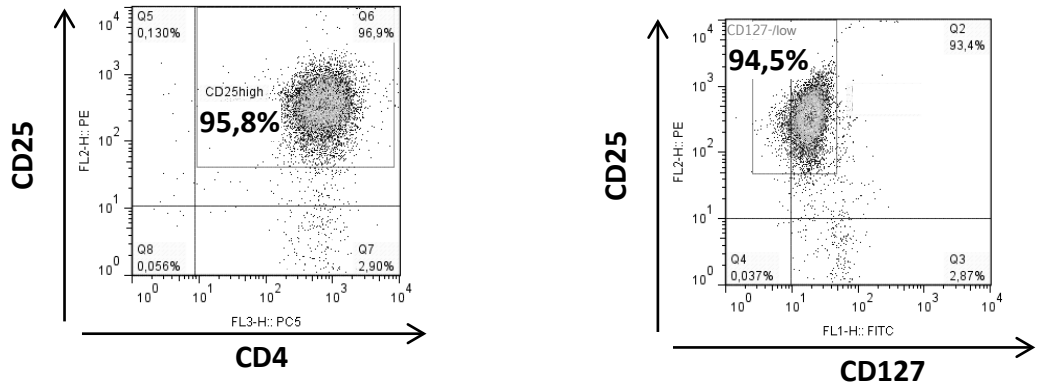
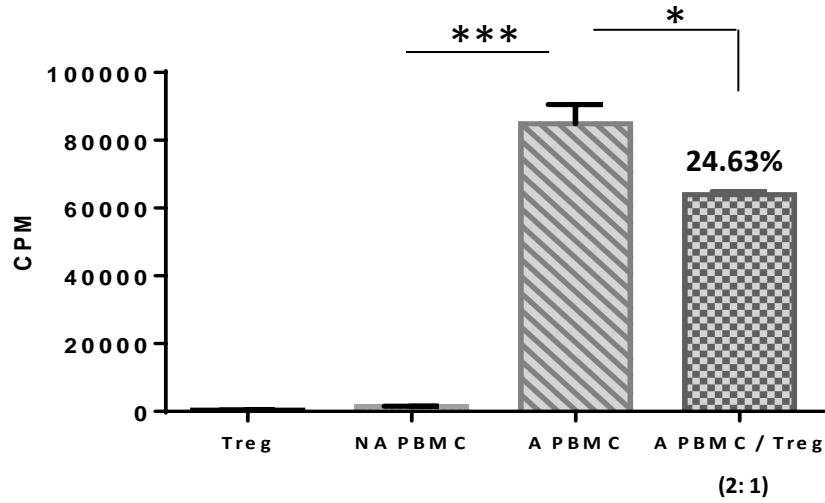
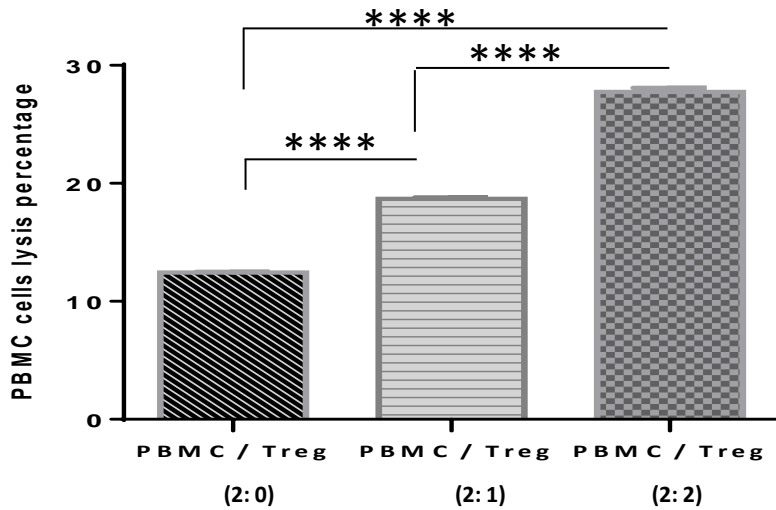
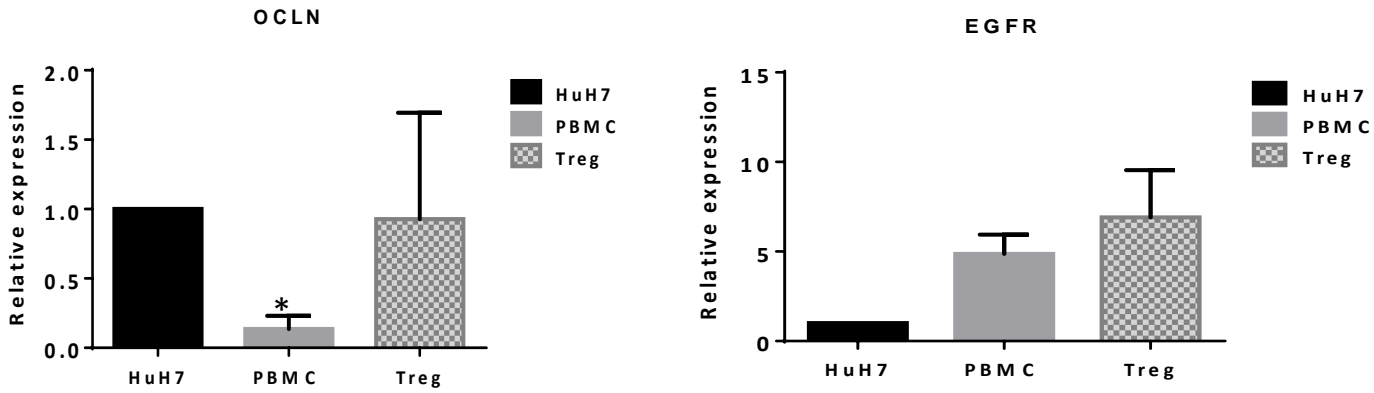
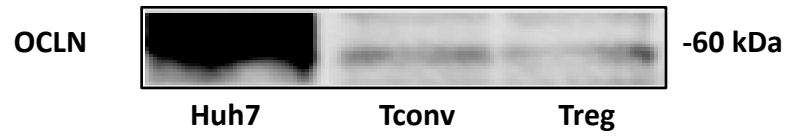
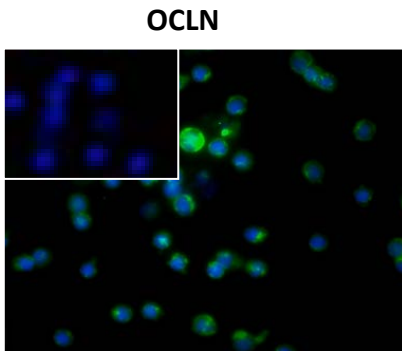
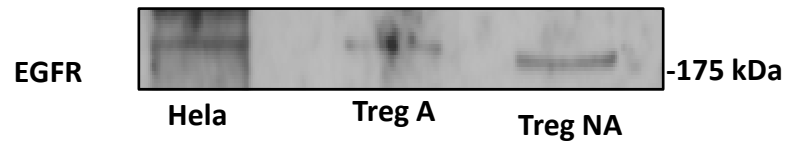
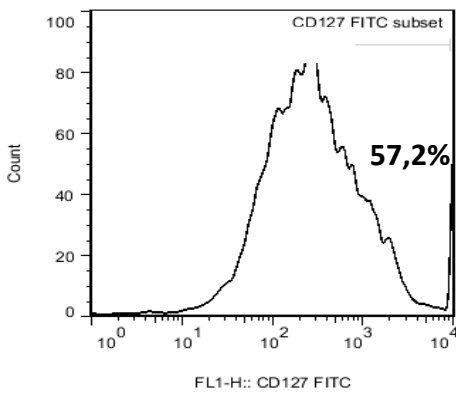


Figure 6b

A**B****Figure 7**

A**B****Figure 2**

A**B****C****Figure S1**

A**B****EGFR****Figure S2**

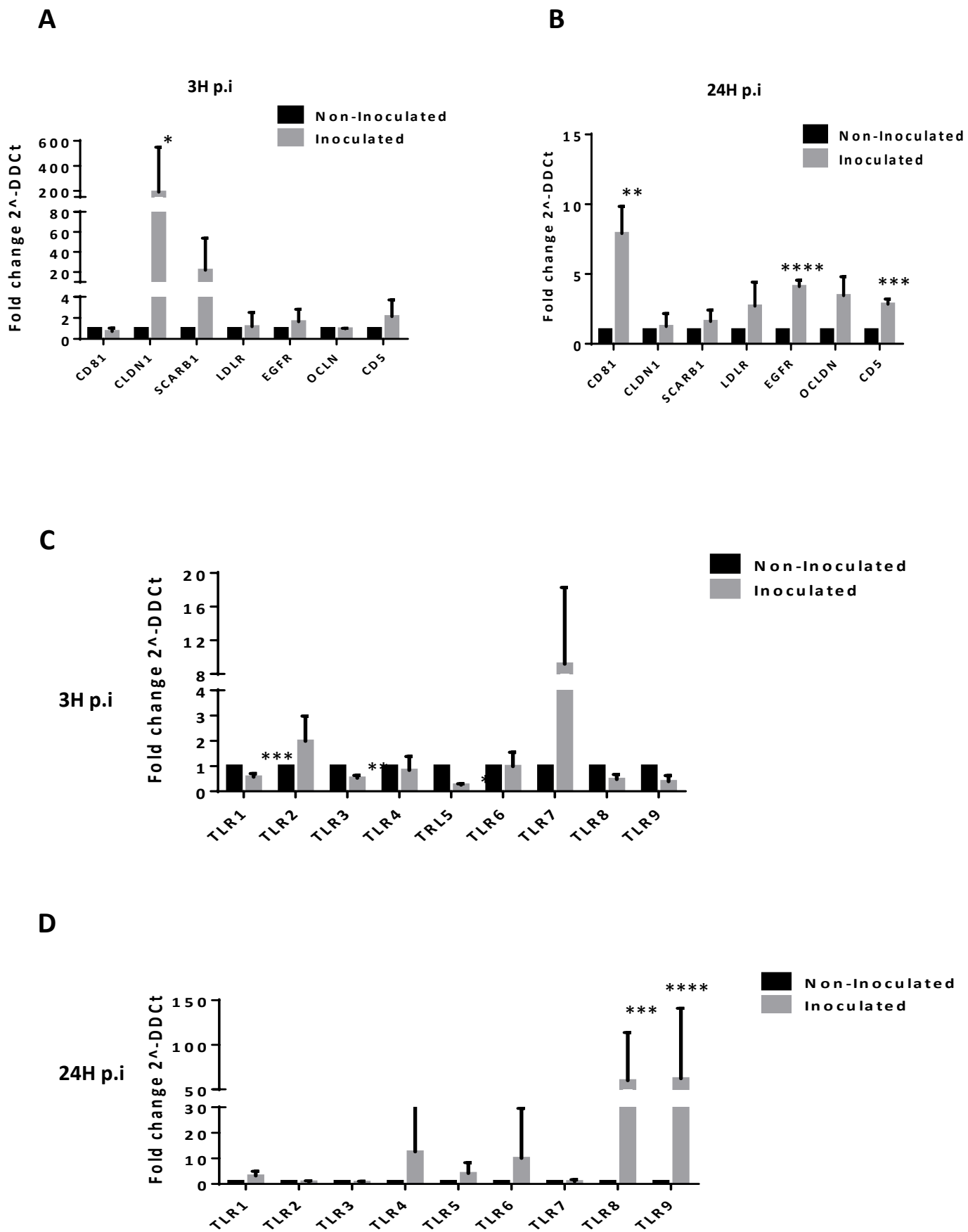
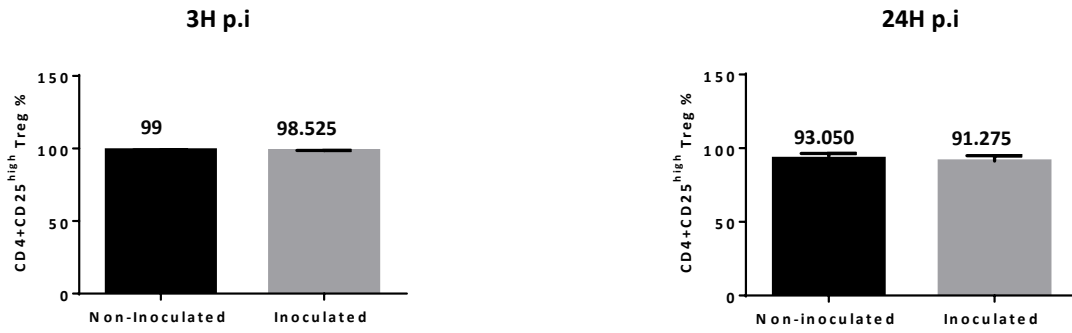
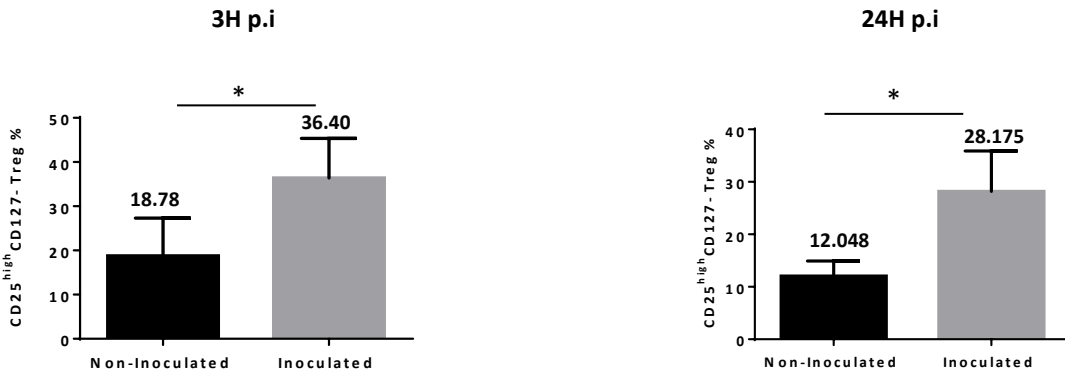
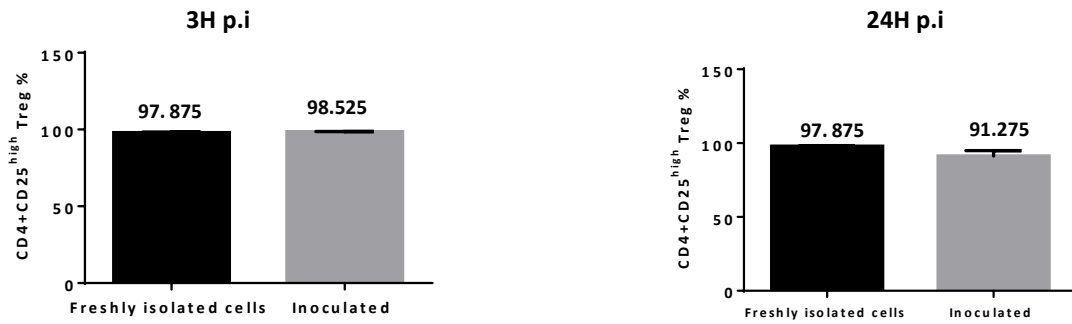
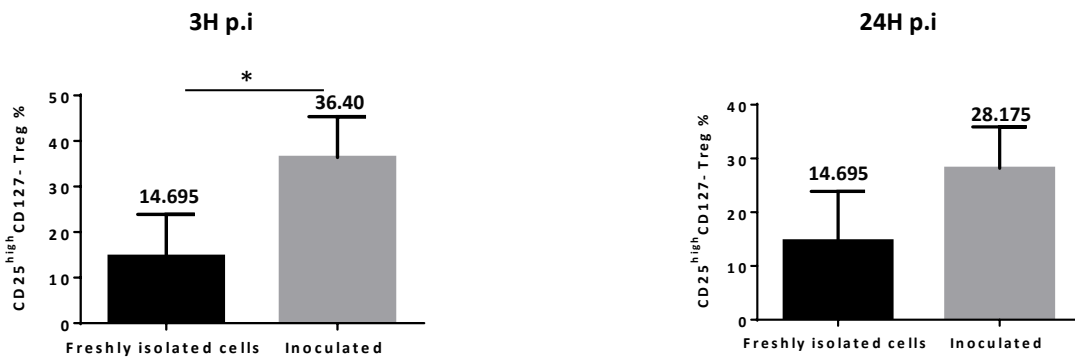
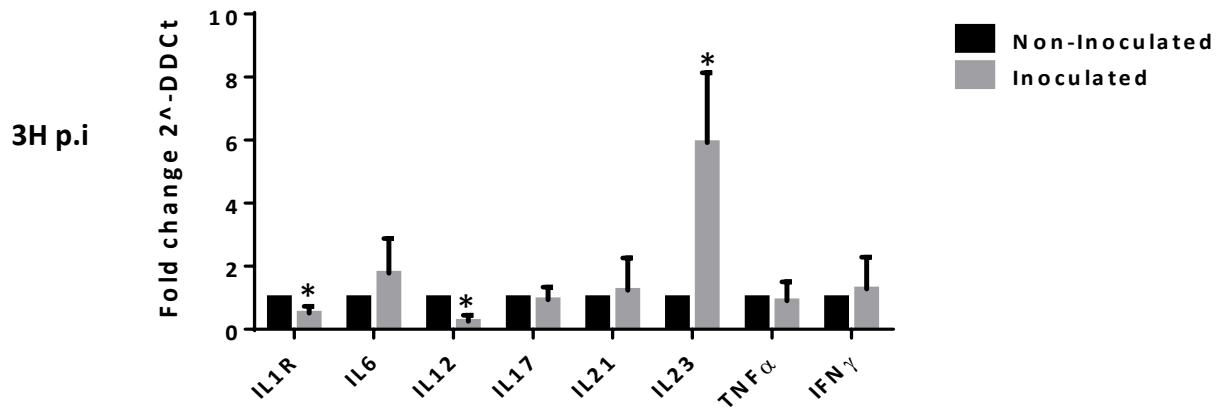
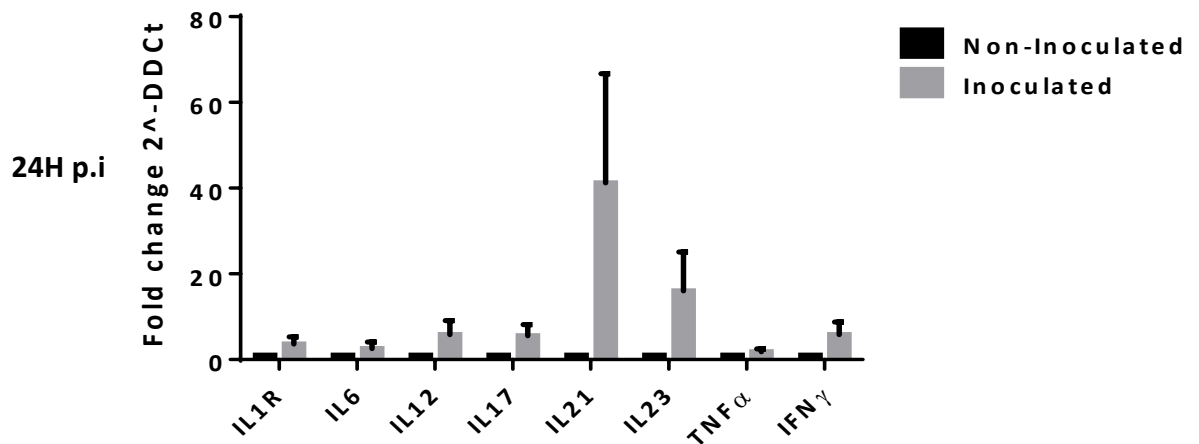
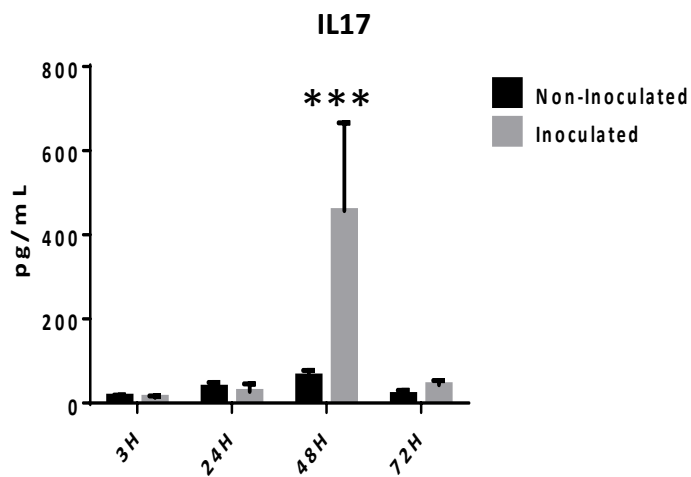
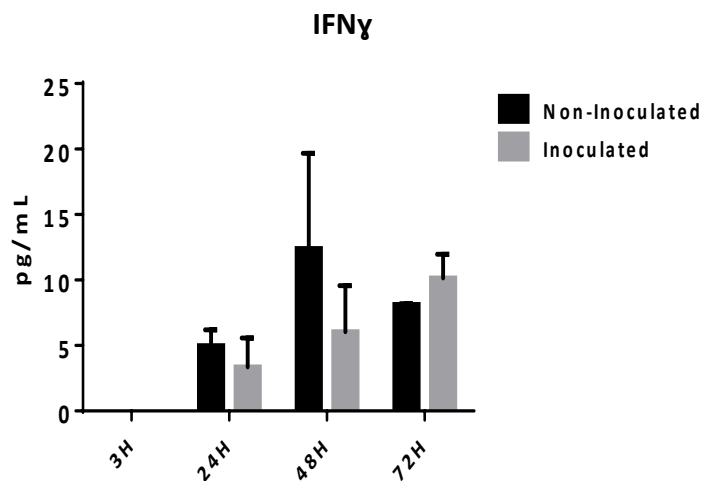


Figure S3

A**B****C****D****Figure S4**

A**B****C****D****Figure S5**

ARTICLE 3

Le Virus de l'Hépatite C Favorise l'Emergence des Lymphocytes T Régulateurs Induits.

Hepatitis C Virus promotes the Emergence of induced Regulatory T Cells.

En préparation

Laurissa Ouaguia, Olivier Moralès, Czeslaw Wychowski, Samah Sfaxi, Manon Devreese, Jean Dubuisson, Yvon Calmus, Filomena Conti, Nadira Delhem.

Mots clés : Virus de l'hépatite C, Lymphocytes T régulateurs induits, Immunosuppression, Conversion, IL-10.

Résumé: L'hépatite C est une maladie chronique pouvant évoluer vers la cirrhose et vers le

carcinome hépatocellulaire (CHC). De nombreuses études, dont les nôtres, attribuent la chronicité de l'hépatite C, en partie, à l'action des lymphocytes T régulateurs humains qu'ils soient naturels (Treg) ou induits (Tr1 ou Th3). En effet, des travaux antérieurs de l'équipe ont décrit une augmentation de la fréquence intra-hépatique des Tr1 au cours de l'évolution de la l'hépatite C vers la cirrhose et le CHC chez un patient chronique VHC+ et nous avons également décrit une augmentation de la fréquence des Tr1 chez les patients développant une récurrence sévère de réinfection du greffon (après transplantation pour cause virale C) comparés aux patients sans récurrence ou avec récurrence minime. Ainsi, l'issue de l'hépatite C semble corrélée à la présence des lymphocytes T régulateurs induits (iTreg). L'enjeu fondamental de ce travail a été de déterminer si le virus de l'hépatite C pouvait induire l'émergence d'iTreg (Th3 ou Tr1) à partir des lymphocytes T conventionnels (Tconv) et favoriser, ainsi, l'aggravation de l'hépatite C.

Matériels et Méthodes : Les lymphocytes T conventionnels ont été isolés à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) provenant de poche de sang de donneur sains après signature d'un consentement éclairé de participation (CPP-EFS). Après isolement, ces Tconv sont phénotypiquement caractérisés par cytométrie en flux. On obtient ainsi une fréquence des Tconv représentant environ 15 à 20% des PBMC avec une pureté de l'ordre de 93%. Les Tconv isolés ont par la suite été mis en culture avec des particules VHCcc/JFH1 ou en culture dans du milieu DMEM récoltés après plusieurs passages de Huh7 non-infectés. Ces particules virales sont obtenus dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr J. Dubuisson qui a obtenu un accord d'utilisation du réplicon de taille complète JFH1 du virus de l'hépatite C. Ces particules virales ont été utilisées pour mimer l'action du virus de l'hépatite C. Ainsi, les Tconv isolés ont été inoculés *in vitro* par les particules virales de VHC à une MOI de 0.4 correspondant à environ 2 virus pour 5 cellules. L'expression des marqueurs cellulaires associés au phénotype des différentes populations d'iTreg a été évaluée par RT-Q-PCR et par cytométrie en flux (FACS). Par ailleurs, la capacité de ces cellules converties à supprimer la réponse immune, a été mise en évidence par un test de suppression (MLR) par incorporation de la thymidine tritiée. L'expression des marqueurs associés à la fonction suppressive des iTreg a également été analysée par RT-Q-PCR ainsi que la sécrétion des cytokines immunosuppressives par ELISA.

Résultats et discussion : Nos résultats de cytométrie en flux montrent que les Tconv isolés sont à 90% CD4+CD25- et à 98% CD127+. Par ailleurs, nos analyses révèlent que plus de 97% des Tconv isolés sont CD4+CD18+CD49b-LAG3-. Nos résultats sont conformes avec les données de la littérature qui montrent que les Tconv non activés sont caractérisés par l'absence d'expression du CD25 et par une sur-expression du CD127. Concernant le CD18, c'est un marqueur très ubiquitaire et peut-être retrouvé sur l'ensemble des lymphocytes T comme des Tconv. Par la suite, nous avons

analysé l'expression génique d'un ensemble de marqueurs associés au phénotype des différentes populations de lymphocytes T régulateurs induits. Ainsi, nos résultats ont montré que l'inoculation des Treg avec le VHC, augmente l'expression du *CD18 (ITGB2)*, *CD49b (ITGA2)*, *CTLA4*, *OX40 (TNFRSF4)*, *BLIMP1 (PRDM1)* et *LAG3*, qui sont des marqueurs associés aux iTreg de type 1 (Tr1). Ces résultats sont en corrélation avec des précédents travaux de l'équipe, qui ont décrit la présence de cellules Tr1 CD4+CD18+CD49b+ chez des patients VHC+. Par ailleurs, de récentes études ont également montré que les Tr1 possédaient le phénotype CD4+CD49b+LAG3+. De façon intéressante, nous avons aussi observé une légère augmentation de l'expression du *CD25* et du *FOXP3*, qui sont des marqueurs généralement associés aux T régulateurs naturels mais qui peuvent aussi être associés aux Th3 ou aux autres iTreg. Ainsi, nos résultats sont en corrélation avec des études qui ont montré que certains épitopes immuno-dominants du VHC étaient capables de générer des iTreg CD4+FOXP3+. Une partie de nos résultats a pu être confirmée par des analyses en cytométrie de flux. En effet, nous n'avons pas observé de différence significative de l'expression concomitante des marqueurs *CD4*, *CD25* et *CD127* entre les Tconv cultivés ou non en présence du VHC. Cependant, de façon intéressante, notre étude a montré une nette augmentation de la fréquence des cellules CD4+CD49b+LAG3+ au sein des Tconv inoculés avec le VHC comparés aux Tconv non-inoculés, suggérant ainsi l'émergence de lymphocytes Tr1. L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que l'interaction du VHC avec les lymphocytes T conventionnels favoriserait leur conversion en lymphocytes T ayant un phénotype régulateur. Ces travaux pourraient expliquer les données de la littérature qui ont décrit une augmentation de la fréquence de Tr1 et Th3 dans le sang de patients chroniquement infectés par le VHC.

Enfin, nous avons voulu nous assurer que ces cellules, potentiellement converties en iTreg, possédaient la capacité de supprimer la réponse immune. Nous avons effectué pendant 48H des co-cultures de PBMC avec des Tconv autologues préalablement inoculés avec du VHC pendant 48H. L'évaluation de la capacité suppressive des Tconv sur la prolifération des PBMC autologues a été mise en évidence par des MLR (mixed lymphocyte reaction). Nos résultats montrent que les Tconv inoculés avec du VHC, sont capables d'inhiber la prolifération des PBMC, et ce dès le ratio de 4 PBMC pour 1Tconv (4 :1). Ainsi, ces résultats sont en corrélation avec les données de la littérature qui ont montré que la transfection du VHC dans des lignées de cellules T (jurkat) favorisait l'émergence de cellules CD4+CTLA4+FOXP3+ capables d'inhiber les réponses des TCD4+ et des TCD8+. Afin de commencer à déterminer les mécanismes impliqués dans cette immunosuppression, nous avons réalisé des analyses transcriptomiques des marqueurs d'activité et nos résultats révèlent que le VHC augmente significativement l'expression de granzyme A (*GZMA*), granzyme B (*GZMB*), *IL-10*, *TGF-β1*, *TGF-β3* et *IL-35 (EBI3)* qui sont toutes des

molécules associées à l'activité immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs. Ces résultats ont été confortés par des analyses par ELISA qui montrent une augmentation de la sécrétion de l'IL-10 par les lymphocytes T conventionnels cultivés en présence du VHC, et ce dès 24H post-inoculation (p.i), confortant ainsi l'hypothèse selon laquelle le VHC favoriserait, l'émergence des Tr1. Ces résultats pourraient expliquer les données de la littérature qui ont décrit une augmentation de la fréquence périphérique des cellules CD4+IL-10+ chez des patients chroniquement infectés par le VHC. De plus, nos résultats montrent une diminution de la sécrétion de l'IL-2 dès 24H p.i, confortant l'hypothèse de l'émergence de cellules régulatrices qui seraient anergiques *in vitro*. De façon intéressante, nos résultats ont montrés une forte sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-17 et ces données sont en parfait adéquation avec la littérature qui a décrit une augmentation de la fréquence des cellules T sécrétrices d'IL-17 dans le foie de patients chroniques VHC+. Ainsi, la mesure d'une forte concentration des cytokines pro-inflammatoires (IL-17 et IFN- γ) et la détection d'une concentration relativement élevée d'IL-10, associée à une faible fréquence de cellules CD4+CD49b+LAG3+ parmi les Tconv cultivés en présence du VHC, suggèrent fortement que, seule une partie des lymphocytes T conventionnels serait convertie en lymphocytes T régulateurs induits.

Conclusion : Nous sommes conscients que ce travail est préliminaire et qu'il faudra clairement caractériser la(les) population(s) régulatrice(s) induite(s) après inoculation des Tconv avec le VHC. Néanmoins, l'ensemble de nos résultats suggère que le VHC est capable de favoriser l'émergence de cellules régulatrices induites à partir de lymphocytes T conventionnels. La description de ces nouvelles propriétés modulatrices du VHC sur des cellules effectrices pourrait, en partie, expliquer les mécanismes par lesquels le virus échappe au contrôle du système immunitaire pour favoriser la progression de l'hépatite C vers la cirrhose et le CHC.

Hepatitis C Virus Promotes the Conversion of Human CD4+ Conventional T cells into Induced Regulatory T Cells

Ouaguia Laurissa (1,2), Olivier Moralès (2), Wychowski Czeslaw (3), Sfaxi Samah (2) Devreese Manon (2), Chantal Samson (2), Dubuisson Jean (3), Calmus Yvon (4,5,6), Conti Filomena (4,5,6), Delhem Nadira (1,2)

Running title: HCV promotes the emergence of induced regulatory T cells

Author's Affiliations:

- (1) Univ. Lille Nord de France
- (2) CNRS- UMR 8161 - Institut de Biologie de Lille- Institut Pasteur de Lille - SIRIC ONCOLille, France
- (3) Inserm U1019-CNRS UMR8204- Centre d'Infection et d'immunité de Lille, France
- (4) UPMC Université Paris 06 & INSERM, UMR_S 938, CdR Saint-Antoine, France
- (5) AP-HP Hôpital Pitié-Salpêtrière, Unité de Transplantation Hépatique, F-75013, France
- (6) Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75005, France

Key Words: Hepatitis C virus, induced-Regulatory T cells, TGF- β , Conversion, Immune suppression

Corresponding Author :

Nadira Delhem, PhD

Institut de Biologie de Lille

1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex

Phone : +33 3 20 87 12 53

Fax : +33 3 20 87 10 19

Email: nadira.delhem@ibl.cnrs.fr

BACKGROUND AND AIMS: Hepatitis C disease, which is related to hepatitis C virus (HCV) infection, is a chronic disease which may progress to cirrhosis and to hepatocellular carcinoma (HCC). Our previous work described, in chronic HCV infected patients, a significant increase of the intra-hepatic type 1-regulatory T cells (Tr1) frequency during the progression of hepatitis C to cirrhosis and HCC. We have also described, after liver transplantation, an increase of the Tr1 frequency in patients developing severe graft recurrence when compared to patients without recurrence or with minimal relapse. Hence, hepatitis C progression seems to be related to the presence of induced regulatory T cells (iTreg). Thereby, the fundamental challenge of this work was to determine whether HCV could induce the emergence of iTreg by interacting directly with human conventional CD4⁺ T lymphocytes (Tconv) and thus promotes the regulatory microenvironment well known in hepatitis C

METHODS: Tconv were isolated from healthy donors and characterized by flow cytometry (FACS). Cells were then incubated with supernatant of HCV infected HuH7 cells at different time point, before sampled for further experiments. Level expression of Tr1 phenotypic markers (CD18, CD49b, CTLA4 and LAG3) as well as level expression of other iTreg markers (CD4, CD25, CD127 and FOXP3) was monitored by RT-QPCR and FACS analysis. Modifications of HCV-inoculated Tconv activity was evaluated regarding the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-2, IL-12A, IFN γ and IL-17) and the expression of anti-inflammatory factors (IL-4, IL-10, TGF- β 1, GZMA and GZMB) by Q-PCR and ELISA. Finally, the potential suppressive activity of HCV-inoculated Tconv was evaluated by MLR using (³H)-thymidine incorporation assay.

RESULTS: Freshly isolated Tconv cells express the phenotype CD4⁺CD25^{-/low}CD127⁺CD18⁺CD49b⁻LAG3⁻ with a purity higher than 92%. HCV inoculation of Tconv seems to increase the expression of several markers related to regulatory phenotype and activity of iTreg such as Tr1 and Th3. Interestingly, these induced regulatory T cells are able to suppress the proliferation of autologous PBMC, along a slight increased secretion of the immunosuppressive cytokine IL-10. Moreover, HCV inoculation of Tconv also increases the gene expression and secretion of major inflammatory cytokines (IL-17 and IFN- γ).

CONCLUSIONS: The elevated secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-17 and IFN- γ), associated with an increased secretion of the immunosuppressive cytokine IL-10 and an increased frequency of CD4⁺CD49b⁺LAG3⁺ among HCV-inoculated Tconv, strongly suggest that a few percentage of these conventional T cells could be converted into induced regulatory T cells during hepatitis C disease .

Abbreviations used in this paper: CD, cluster of differentiation; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; ELISA, enzyme-linked immunosorbant assay; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FOXP3, forkhead box protein 3; GZMB, granzyme B; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; IFN γ , interferon gamma; iTreg, induced regulatory T cells; LAG3, lymphocytes activating gene 3; IL-10, interleukin 10; mRNA, messenger ribonucleic acid; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; p.i, post-inoculation, Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction; TGF- β 1, transforming growth factor beta 1; Th3, induced regulatory T helper 3; Tr1, induced regulatory T cells type 1, Treg, regulatory T cells.

1. INTRODUCTION

Hepatitis C is a public health problem that affects about 2 to 3% of the population worldwide [1]. Numerous studies have indicated that its causal agent called hepatitis C virus (HCV) principally target hepatocytes [2, 3], but other studies have mentioned a possible viral lymphotropism [4]. Physiologically, HCV inoculation induces a significant secretion of IFN-based anti-viral cytokines, leading to the transcription of many ISGs (interferon stimulating genes) [5]. Thus, it successively develop an innate immune followed by an adaptive response that is principally mediated by B cells, CD8 + and CD4 +T lymphocytes which are the major players in the anti-viral response [3].

CD4+T cells are essential actor of the immune response against HCV inoculation and their recruitment within the infected liver is generally associated with the decrease of the viral load [6]. Indeed, many studies have highlighted the development, in HCV infected patients, of a peripheral and intra-hepatic CD4+T cells responses specific of the virus proteins [7, 8]. Even if the main HCV epitope involved in the T-cell receptor of CD4+ T cells is not well characterized, several studies hypothesized that it could be the capsid protein (Core), the envelop glycoproteins (E1 and E2) and/or the non structural HCV proteins (NS3 and NS4) [9, 10]. Moreover, positive correlations have being described between the CD4+T cell response and the spontaneous or the drug-induced viral clearance [11, 12]. Indeed, there is an up-regulation of anti-viral pro-inflammatory cytokines (IFN γ , IL-2 and TNF α) in HCV infected patient that didn't develop a chronic

disease compare to evolutive chronic patients which exhibit large quantity of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 [13-16]. In addition to their anti-viral properties, these inflammatory cytokines are able to favor antibody production by B cells, to increase phagocytosis by macrophages and to potentiate the cytotoxic activity of CD8+T cells [17, 18]. All these anti-viral responses are implemented by the immune system of the host with the aim of establishing an anti-viral environment in order to limit the spread of the virus and promote healing. However, in about 80% of patients, despite the development of immune responses, hepatitis C evolves chronicity and gives rise to cirrhosis and to hepatocellular carcinoma (HCC) [19]. Recently, new efficient direct acting anti-viral drugs (DAA) have been developed but some studies have shown that they do not have any impact on end-stage liver diseases following HCV inoculation [20]. Hence hepatitis C is not only a viral disease but also a liver pathology. Numerous studies have attributed this chronicity to viral mutation and persistence, CD4+ and CD8+ effector T cells failure, CD4 T cells anergy, impaired cytokine production, altered dendritic cell function and activation of regulatory T cells [21].

Regulatory T-cells are specialized subsets of the adaptive immune response that are able to recognize self antigen peptides presented by MHC class II through their TCR. Treg cells suppress the auto-reactive T cells, reduce inflammation, induce tolerance and modulate the immune response of the host in the context of autoimmune pathologies, allergy or Virus-induced cancers [22-24]. Based on their origin and their major mechanism of action, we can distinguish thymic-derived Treg called "natural" Treg (nTreg or Treg) and induced Treg cells (iTreg) which involves peripherally-derived Treg (pTreg) and *in-vitro* generated Treg [25, 26]. These iTreg are generally expressed at chronic infection sites where they handle the peripheral tolerance[27]. iTreg resulted from (i) activation of matured T cells under specific antigen exposure, (ii) activation of matured T cells under immunosuppressive cytokine activity or (iii) from conversion of conventional T cells CD4+CD25- [28-30]. Based on phenotypic membranous markers and depending on the immunosuppressive cytokine production, we can distinguish 4 different sub-types of iTreg: type 1 regulatory T cells (Tr1) major producers of IL-10; regulatory T helper 3 (Th3) major producers of TGF- β ; regulatory iTR35 major producers of IL35 and other iTreg which express the transcription factor FOXP3 [31]. The best known iTreg remains Tr1 which are principally characterized by the expression of CD4, CD18, CD49b and LAG3 [32, 33], and by an excessive production of IL-10, a moderate expression of IL-4 and

minimal expression of IL-2 [34]. Our previous works have described an increased intra-hepatic frequency of Tr1 cells during the development of liver damages to cirrhosis and HCC in a chronic HCV infected patient [35]. In addition, we have also shown an increased expression of Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation [36]. Furthermore, we also suggest that Tr1 cells frequency may predict the response to anti-viral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation [32]. Few studies have shown that infected hepatocytes secreted largest amount of TGF- β which favor the induction of iTreg from CD4+T cells [37]. However, the direct impact of hepatitis C virus on conventional T cells which may lead to the emergence of induced regulatory T cells have never been investigated. In this study, we report that conventional cells are characterized by the phenotype CD4+CD25-CD127+CD18^{high}CD49B-LAG3-. We also record that HCV inoculation of Tconv cells increases the expression of regulatory markers of Tr1 (CD4, CD18, CD49B, CTLA4 and LAG3), which is correlated with an increase of the gene expression and secretion of the immunosuppressive cytokine IL-10. More interestingly, we showed an increase of the percentage of CD4+CD49b+LAG3+ into HCV-inoculated Tconv. Finally, our results show that these HCV-inoculated Tconv can efficiently inhibit the autologous PBMC proliferation. Taken together, our study strongly suggests that there is a direct impact of HCV on Tconv cells leading to the emergence of few induced regulatory T cells which could favor the viral persistence and promote the liver disease progression.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Donors and isolation of Immune cells

Human blood samples were collected from healthy adult donors after obtaining informed consent in accordance with approval of the Institutional Review Board at the Biology Institute of Lille. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on Ficoll-PaqueTM PLUS gradient (GE HEALTHCARE, France), washed with Phosphate Buffer Saline (Life Technologies, France) and then filtered through sterilized nylon filter of 100 μ m (Saati, France). CD4+ natural regulatory T-cells (Treg) and conventional T-cells (Tconv) cells were isolated from filtered PBMC, using CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec GmbH, Germany) according to the manufacturer's instructions. Obtained Tconv frequency was around

5.95% to 12.73% of circulating PBMC and 78.21% to 93.22% of total peripheral CD4⁺T cells and Tconv purity was higher than 92%.

2.2. Flow Cytometry Analysis

Immune cell phenotypes were analyzed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer powered by CellQuest Pro software (Becton Dickinson, USA). The harvested cells (1.10^5) were washed with PBS and labeled with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs). For the detection of cell surface human immune-antigens, samples were incubated 15 min, in the dark and at room temperature with the following antibodies: Mouse anti-human CD4-phycoerythrin(PE)-cyanin(Cy)5 (BD Pharmingen, USA), Mouse anti-human CD25-PE (Miltenyi Biotec, Germany), Mouse anti-human CD127-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Clinisciences, France), Mouse anti-human CD18-PE (BD pharmingen, USA), monoclonal human CD49b-FITC (Miltenyi Biotec, Germany), Mouse anti-human CD49b-FITC (BD pharmingen, USA) and human LAG3-PE (R&D systems, France) according to the manufacturer's instructions.

After incubation, labeled cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Santa Cruz Biotechnology, USA) before flow cytometry analysis. For each assay, appropriate isotype control mAbs and the non-labeled fractions were used for marker settings and/or as controls. The results obtained were analyzed under Flow Jo software (Tree Star Inc., USA).

2.3. Culture Conditions and Viral inoculation

We obtained infectious HCV virions produced in cell culture (HCVcc) after transient transfection of full genomic replicon (JFH-1) in Huh7 cell lines. Huh7 cells were cultured in complete DMEM Glutamax medium (Invitrogen, UK). Isolated Tconv cells were cultured in flat bottom 48 well plates at a rate of 1.5 to 2.10^6 cells per well and activated with plate-bound anti-CD3 mAb (1 μ g/mL) (provided by A. Tsicopoulos, France) incubated at 37°C 2 hours before the culture and soluble mouse anti-human CD28 mAb (100ng/mL) (Clinisciences, France) was added extemporaneously. Cells were incubated for 3, 24, 48 and 72 hours in the presence of HCVcc/JFH-1(MOI 0.4) present in the supernatant of Huh7. Negative control of infection was carried out by cultivating the cells in conditioned medium obtained after several passages of non-infectious Huh7. Control of infectivity of HCVcc was always performed on naive Huh7 cell lines.

According to the experiment, cells were either, (i) fixed with 4%PFA for flow cytometry or (ii) directly lysed in RLT buffer (QIAGEN, Germany) for the extraction of total RNA for QPCR. Furthermore, culture supernatants were harvested and frozen at -80°C for ELISA assays.

2.4. Cell Proliferation Assay

Proliferation assays were set up with 1.10^5 PBMC or 1.10^5 Tconv in round bottom 96-well plates (Nunc, Denmark) and cultured for 48 hours in RPMI-1640 medium (Invitrogen, UK) supplemented with 0.02mM L-Glutamin, 0.02mM of sodium-pyruvate, 100U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin and 10% of human AB Serum (BioWest, France). Cells were previously activated as described above. Proliferation was measured after [³H]-thymidin (1 Ci/well; GE Healthcare, France) addition for the last 18 hours. After 48h of culture cells were harvested on glass fiber filter (Wallac, Finland) using Tomtec harvester (Wallac). The filter was then sealed in a sample bag after drying and addition of scintillation liquid (Beckman Coulter). Radioactive thymidine, incorporated into replicated cellular DNA by proliferative cells, was detected by scintillation counting using a 1450 Trilux β-counter (Wallac). Each proliferation assay was carried out in triplicate and estimated in count per minute (cpm) or in proliferative index and results were normalized compared with non-treated conditions.

2.5. Cell Suppression Assay (Mixed Leukocyte Reaction)

Suppressive activity of iTreg was measured by their ability to inhibit the proliferative responses of activated autologous PBMC in mixed leukocyte reaction (MLR). Assays require a co-culture of fixed 1.10^5 PBMC and Tconv cells at different ratios (4:4, 4:3, 4:2, 4:1) in round bottom 96-well plates for 48 hours at 37°C, 5% CO₂. Cells were activated with anti-CD3 mAb and anti-CD28 as previously described. Inhibition of PBMC proliferation induced by iTreg was measured as described above. The non-inoculated Tconv were used as control. Each assay was performed in triplicate and the results were expressed with mean values and standard error either in cpm or in Suppression index.

2.6. Cytokine detection (SANDWICH ELISA)

Cytokine secretions of IL-10, TGF-β1, IL-2, IL-4, IL-17 and IFNγ were determined by Sandwich ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) method. Briefly, purified primary antibodies were coated overnight

at 4°C in flat bottom 96-well plates (NUNC, Denmark) before incubation with samples. The corresponding biotinylated antibodies were added for protein detection. The reaction was amplified with Streptavidine-peroxydase (Interchim, UK). Cytokines concentration was finally highlighted with the addition of OPD (Sigma-Aldrich, USA). After development, the plates were read in Multiskan spectrophotometer at 492 nm. The purified and biotinylated antibodies used were the following: Mouse anti-human IL-2, mouse anti-human IL-4, Rat anti-human IL-10, mouse anti-human IFN γ , Rat anti-human TGF- β 1 (BD Pharmingen, USA) and Mouse anti-human IL-17 (R&D system, France). Results were expressed in pg/mL as the mean of duplicate wells after subtracting background values.

2.7. Real-Time Quantitative PCR assays

RNA extraction from primary immune cells: Tconv cells were inoculated with HCVcc at different time point (3, 24, 48 and 72 hours). The non-inoculated cells were used as negative controls. RNA extraction was performed using at least 1.10^6 cells with the RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Germany) according to manufacturer's instructions. The cellular dry pellet was lysed in RLT Buffer supplemented with 1% β -mercaptoethanol (Sigma Aldrich, USA). Genomic DNA and cell debris were discarded by adding 70% Ethanol (VWR PROLABO Chemicals, France) and total RNA was eluted using DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen, USA).

Before reverse transcription, we performed a DNase treatment using the kit Message clean (GenHunter Corp, France). RNA concentration, integrity and purity were measured by A260/280 spectrophotometry measurement on Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, France) and 1% agarose gel electrophoresis (Invitrogen, USA). Extracted RNAs were stored at -80°C until further use.

mRNA Reverse Transcription: Synthesis of the complementary DNA (cDNA) was achieved using the Reverse Transcriptase kit SuperscriptTM II (Invitrogen, USA). 500ng to 2ug of total RNA were supplemented with 5 μ L of a master mix consisting of oligo dT (Roche Diagnostic, France), RNAsin (Promega, France) and DNase-Rnase-free distilled water (Invitrogen) followed by 10min of incubation at 70°C. After 5 minutes at room temperature, 10 μ L of the following mix were added: dNTPs (Amersham Biosciences, UK), RNAsin, buffer 5X, dithiothreitol and Superscript II (Invitrogen, USA). The reaction was then followed by an initial

incubation step of 1 hour at 45°C with a second incubation of 5 min at 95°C. Residual RNAs were removed with RNase H treatment (Promega, France) for 20 min at 37°C. Finally, ultrapure distilled water (Life Technologies, France) was added to obtain a cDNA final concentration of 10ng/μL stored at -20°C until further use.

Mx3005PTM Sequence Detection System: Primers were specifically designed for the Q-PCR and allowed the amplification of the genes encoding a set of markers associated with iTreg and Tconv (see table 1). The List of all primers is resumed in the *Table 1*. The results are normalized with 5 housekeeping genes (HKG): G3PDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase), HPRT (Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transferase), β-actin, 18s and Ubiquitin.

Transcripts were quantified using optical 96 well reaction plates (Eurogentec, Belgium) incubated in the Mx3005P™ sequence detection system (Agilent technologies, France). Q-PCR was performed with the kit MESAGREEN qPCR MasterMix PLUS for SYBR Assay (Eurogentec, Belgium) according to the manufacturer's instructions. Each reaction well contains: 10 μl of sense and non-sense primers at 0.1μM, 9μL of 2X reaction buffer MESA GREEN and 1μL (10ng) of cDNA. The PCR program included initial denaturation and MeteorTaq activation for 5 min at 95°C, followed by 45 standard amplification cycles consisting of 15 sec at 95°C (denaturation) and 1 min at 60°C (annealing and elongation). The fluorescence intensity is measured at the end of each elongation cycle and a melting curve analysis was carried out immediately after amplification, in accordance with the manufacturer's instructions.

Data Expression: Q-PCR reactions were used to quantify the gene expression modification of cell markers on immune and hepatic cells. The quantitative analysis was achieved by using the cycle threshold (C_T) value for each well calculated with MxPro Software. Each individual value was normalized by using the mean of the 4 HKG according to the standard ΔC_T method: $\Delta C_T = C_T - C_{THKG}$. The expression of each gene in inoculated group is then compared to its expression in the reference non-inoculated group leading to $\Delta\Delta C_T$. The fold change or quantitative relative gene expression was obtained by using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [38].

2.8. Statistical analysis

Results are given as mean \pm SEM. Data were analyzed using Prism 6.0 software (Graph Pad Software Inc.). All quoted P-values are two-sided, with $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.001$ (**), $P \leq 0.0001$ (***) and $P \leq 0.00001$ (****) being considered statistically significant for the first and highly significant for the others.

3. RESULTS

3.1. Phenotypic characterization of freshly isolated conventional T cells (Tconv).

As shown in Figure 1A, isolated conventional TCD4⁺ cells represent a distinct population exhibiting a specific cell granularity (SSC) and a cell size (FSC) forming a grouped population with a purity of 97%. Based on CD4, CD25 and CD127 protein expressions, we show that more than 91% of these Tconv are CD4⁺CD25⁻, very few Tconv (7%) are CD4⁺CD25^{low/+}, only 1% of Tconv are CD4⁺CD25^{high} (nTreg) but all the isolated Tconv are CD127⁺ (>97%) (Figure 1B). In addition, Based on CD4, LAG3 and CD49b protein expressions, our results show that 94% of Tconv are CD4⁺LAG3⁻ and more than 97% of these Tconv cells are CD4⁺CD49b⁻LAG3⁻ (Figure 1C). We also showed that isolated Tconv were more than 99% to express the phenotype CD4⁺CD18⁺CD49b⁻. Taken together, these results show that freshly isolated conventional T cells exhibit the phenotype CD4⁺CD25⁻CD127⁺CD18⁺CD49b⁻LAG3⁻.

3.2. HCV inoculation modifies the Tconv gene expression in favor of a regulatory transcriptome profile.

We first analyzed the impact of HCV inoculation on the phenotype of conventional T cells. As shown in Figure 2, HCV inoculation do not really change the mRNA expression of CD25 (*IL2RA*), CD127 (*IL7RA*) and *FOXP3* phenotypic markers either at 3H, 24H, 48H or 72H in HCV-inoculated Tconv when compared to control cells inoculated with supernatant of non-infected HuH7 (Non-inoculated Tconv). However, our results reveal a significant increase in the expression of *CD18* phenotypic markers at 3H and 24H post-inoculation (p.i) (Figure 2A, 2B). We also report a significant mRNA increase in the expression of *CD49b* phenotypic markers at 24H p.i (Figure 2B) and a significant increase of phenotypic marker *LAG3* at 3H, 48H and 72H p.i in HCV inoculated Tconv compared to Non inoculated Tconv (Figure 2A-2D). At 96h, our result

also show an increase expression of *FOXP3* and *CD18* markers on in treated cells compared to control (Suppl Figure S1A). In this study, we next report a progressive increase expression of *CD4*, *CTLA4*, *BLIMP1* (*PRDM1*) and *OX40* (*TNFRSF4*) markers in HCV-inoculated Tconv compared to non-inoculated Tconv from 3H p.i to 72H p.i. (Figure 2). In summary, this gene expression analysis reveals that HCV increases the expression of 13 markers related to induced-regulatory T cell phenotype.

3.3. HCV-inoculated Tconv cells acquire a CD4+CD49b+LAG3+ Tr1 regulatory phenotype

To evaluate whether HCV inoculation may induce the emergence of induced regulatory T cells, we analyzed, using cytometric analysis, the frequency and the percentage of regulatory T cells within HCV-inoculated Tconv. As presented in figure 3A, HCV inoculation seems to decrease the frequency of CD4+CD25+ cells within inoculated Tconv compared to Non-inoculated Tconv. However, there were no differences in the percentage of CD25^{high}CD127- within both groups (Figure 3B). Our data do not reveal any significant differences in the frequency of CD4+CD18+ cells within Tconv (Figure 3C), but there is a marked increase of LAG3+CD49b+ cell frequency within HCV-inoculated Tconv when compared to the control (Figure 3D), suggesting that HCV inoculation induces a slight conversion of Tconv cells into CD4+CD49b+LAG3+ iTreg cells.

3.4. HCV-inoculated Tconv cells acquire a suppressive property.

In order to evaluate the suppressive capacity of induced-regulatory T cells emerging from HCV-inoculated Tconv, we addressed their proliferation by thymidine incorporation technique. As shown in figure 4, HCV inoculation significantly induces the *in vitro* proliferation of isolated CD4+CD25^{high}CD127^{low}CD18⁺CD49b⁺LAG3⁺ T cells. After washing, we added different ratios of those Tconv to autologous PBMC culture in activated conditions for 48H. As presented in Figure 4, activation induced a significant increase of PBMC proliferation as well an increase of the Tconv proliferation but this last was significantly higher in HCV-inoculated Tconv. More interestingly, our result showed that HCV inoculated Tconv suppress the proliferation of PBMC by around 40.05% at a ratio 4:4 (Figure 4A); 32.75% at a ratio 4:3 (Figure 4B), 47.91% at a ratio 4:2 (Figure 4C) and 43.87% at ratio 4:1 (Figure 4D) in comparison to Non-inoculated Tconv which do not. In addition, we showed that the suppressive activity of induced regulatory

Tconv was observable since the ratio 4 PBMCs to 1 Tconv (4:1) but this inhibition become significant at the ratio 4:4 (Suppl Figure S1B).

3.5. HCV-inoculated Tconv cells up-regulate the expression of genes related to iTreg activity.

We further examined the gene expression of a panel of markers both involved in Tconv and iTreg activity. Consistent with the suppressive effect observed above, HCV inoculation increases the mRNA expression of the suppressive cytokine *IL-10* over time (Figure 5). Our data also show a slight increase of *TGF- β 1* suppressive cytokine at 3H p.i (Figure 5A) and 72H p.i (Figure 5D), associated with a progressive increase of the *TGF- β 3* expression from 3H p.i to 72H p.i (Figure 5). In addition, we observed an increase of the inhibitory factors *IL-12A* (IL-35 sub unit), *EBI3* (IL-35 sub unit) and Granzyme B (*GZMB*) at 3H, 24H, 48H and 72H p.i (Figure 5). We also report an over-expression of *GZMA* at 24H p.i (Figure 5B) and over-expression of *GZMB* at 96H p.i (Suppl Figure S1C). Furthermore, our data report an increased expression of functional markers IL-4 and IFN γ in HCV-inoculated Tconv compared to the control, especially at 24H p.i (Figure 5B) and 72H p.i (Figure 5D). However, we observed a significant decreased expression of IL-2 functional marker at 3H p.i, followed by a slight increase since 24H p.i (Figure 5B-5D). All these data confirm that HCV inoculation profoundly alter the function of Tconv cells.

3.6. HCV inoculation modifies the secretion of cytokines in favor of a regulatory cytokine profile.

To confirm whether HCV inoculation may alter the secretome of Tconv, we analyzed the levels of immunosuppressive cytokines secretion (IL-10 and TGF- β 1) by HCV-inoculated Tconv in activated conditions. Consistent with the mRNA expression, there was a gradual increase of IL-10 secretion by HCV-inoculated Tconv when compared with to non-inoculated Tconv (Figure 6A), even if this increase was not statistically significant. Moreover, we did not observed a significant difference regarding the production of TGF- β 1 in both groups (Figure 6B). Interestingly, we observed a marked increase in the production of IL-4 in HCV-inoculated Tconv compared to the non-inoculated control (Figure 6C). We also showed a slight decrease of the IL-2 secretion by inoculated Tconv especially at 24H p.i (Figure 6D), that may correspond to the mRNA decrease observed at 3H p.i (Figure 5A). All together, these data suggest that HCV inoculation may alter the Tconv secretome in favor of an immunosuppressive cytokine secretion profile.

3.7. HCV-inoculated Tconv cell increase their secretion of IFN γ and IL-17 pro-inflammatory cytokines

We further evaluated the production of the common pro-inflammatory cytokines (IFN γ and IL-17) by HCV-inoculated Tconv. Even if it is not statistically significant, our study shows that HCV inoculation induces an increased production of the anti-viral cytokines IFN γ (Figure 7A) and of the pro-inflammatory cytokine IL-17 by (Figure 7B) by HCV-inoculated Tconv when compared with non-inoculated Tconv. This result confirms the hypothesis that viral inoculation lead principally to the development of anti-viral response.

4. DISCUSSION

Numerous studies have reported an increased frequency of regulatory T cells both, at the peripheral and at the intra-hepatic levels, in chronic HCV infected patients [35, 39-42]. Indeed, few studies have shown that some immuno-dominant HCV epitopes may induced the emergence of CD4+FOXP3 iTreg able to suppress the effector T cells [43]. In addition, other studies have shown that tolerogenic dendritic cells isolated from HCV patients were able to generate iTreg from Tconv [44, 45]. Hence, suggesting that an increase of regulatory T cells frequency in chronic HCV patients may result, not only, from an expansion of natural regulatory T cells (Treg) but also from a conversion of conventional T cells into induced regulatory T cells. However, none of these studies have evaluated the direct impact of hepatitis C virus on the emergence of induced regulatory T cells from conventional T cells. In this report, we demonstrated that HCV inoculation of Tconv cells may favor the development of suppressive iTreg. After isolating and characterizing human Tconv, our results show that these cells are CD4+CD25-CD127+. These results are consistent with literature data showing that conventional activated T cells are characterized by the absence of CD25 expression and over-expression of CD127 [46-48]. Our results also showed that Tconv cells were 97% CD4+CD18+CD49b-LAG3-. These results are in agreement with the literature showing that the CD18 molecule is ubiquitous and expressed on the surface of cells of hematopoietic origin such as T CD4+ lymphocytes [49]. In addition, our experiments show that *in vitro* activation of these Tconv promotes their proliferation, thus reinforcing the hypothesis that we have isolated fully functional Tconv. This result is

confirmed by the literature which has shown that in contrast to regulatory T cells, conventional T activated lymphocytes were able to proliferate *in vitro* upon activation [50, 51].

To investigate the direct impact of HCV on Tconv, we first analyzed the modification of phenotypic markers gene expression within HCV-inoculated Tconv. Indeed, some reports have shown that human T lymphocytes can be inoculated by HCV through the CD5 receptors [4] but none have study the impact of HCV infection on the Tconv phenotype. Our results showed that HCV significantly increased the expression of CD18 (*ITGB2*), CD49b (*ITGA2*), *CTLA4* and *LAG3* markers by Tconv. These markers are known as phenotypic markers of induced Treg especially regulatory type 1 cells (Tr1) which are described as CD4+CD18+CD49b+LAG3+[33, 36]. Hence, our first results suggested that HCV inoculation changed the Tconv phenotype in favor of a regulatory profile that might be Tr1. This hypothesis is in correlation with previous work in which we described an increased frequency of Tr1 CD18+CD49b+ in chronically HCV infected patients and in transplanted patients [22, 35, 36, 39]. Our data also showed a slight increase in the gene expression of *CD25* and *FOXP3* markers, which are typically associated with natural regulatory T cells [52]. However, many studies have shown that the induced expression of FOXP3 in Tconv *via* a retro-viral translation may also result from the conversion of Tconv into induced regulatory T cells [53]. Finally, our transcriptomic analysis showed an increase of Blimp1 (*PRDM1*), GITR (*TNFRSF18*), OX40 (*TNFRSF4*), CD39 (*ENTPD1*) and CD73 (*NT5E*) mRNA expression by HCV-inoculated Tconv cells. These markers have been also associated with some induced regulatory T cell [54, 55]. In addition, some studies have shown that the Th3 induced regulatory T cells can also exhibit the regulatory phenotype CD25+FOXP3^{+/}-CTLA4+ [56-58]. Furthermore, few studies have shown that HCV epitope were able to generated iTreg CD4+FOXP3+ [43]. Hence, taken together all these data support the hypothesis that HCV may induce the emergence of induced regulatory T cells.

To reinforce this statement, we evaluated the frequency of regulatory populations in HCV-inoculated Tconv cells. Cytometric analyzes showed no significant differences in the frequency of CD4+CD25^{high}CD127- cells between HCV-inoculated Tconv and non-inoculated T conv. However, we showed a marked increase in the frequency of LAG3+CD49b+ cells within inoculated Tconv compared to controls, thus confirming the

hypothesis of the emergence of induced regulatory Tr1 cells. This data correlates with previous studies in which we described an increase intra-hepatic frequency of Tr1 cells in HCV infected patient and which showed that Tr1 expressed the CD49b+ LAG3+ phenotype [35]. It also correlate with various studies that showed an increased prevalence of Tr1 and Th3 cells in the blood of patients chronically infected with HCV [41, 42]. These strongly suggest that HCV inoculation of Tconv cells could promote the emergence of induced regulatory T cells which are potentially immunosuppressive.

Next, we wanted to investigate the suppressive potential of these generated iTreg (Tr1, Th3 or other iTreg). Our results showed that HCV significantly increased Tconv proliferation. This data is consistent with the literature since it is known that viral infection promotes the proliferation and expansion of immune cells [59]. Our results also showed that Tconv previously cultured with HCV were able to inhibit the proliferation of autologous PBMC. These results are very interesting because they suggested that the generated iTreg exhibit suppressive capacity that impacts the immune system response in HCV patient. This hypothesis is supported by data from the literature which showed that HCV transfection into human T cell lines (Jurkat cells) could promote the emergence of regulatory CD4+CTLA4+FOXP3+ cells able to inhibit the CD4+ and CD8+ responses [60]. In addition, recent studies have shown that CD4+ T cells that express the HCV Core protein, was able to over-express FOXP3 and inhibit effector T cells [61]. Thus, our results clearly suggest that HCV promotes the emergence of suppressive induced-regulatory T cells.

In order to investigate the mechanisms involved in this immune suppression, we performed transcriptomic analyzes showing that HCV inoculation significantly increases the expression of granzyme A (*GZMA*), granzyme B (*GZMB*), *IL-10*, *TGF-β1*, *TGF-β3* and *IL-35* (EBI3 sub unit), which are molecules associated with immunosuppressive activity of induced regulatory T cells [62, 63]. Indeed several studies have shown that IL-10 is mainly secreted by Tr1 cells [30] while the TGF-β1 is mainly secreted by Th3 cells [64, 65], thus suggesting that the generated iTreg could be Tr1 and/or Th3 cells. These findings were reinforced by ELISA analysis showing that HCV inoculation increased slightly the secretion of IL-10 by conventional T cells, suggesting the emergence of Tr1 cells. These results are consistent with previous work of the team which have described an increased frequency of peripheral CD4+IL-10+ in chronic HCV patients

[40, 66]. In addition, our results showed an increased secretion of IL-4 by HCV-inoculated Tconv, which strongly reinforced the idea of a Th3 cells emergence. Indeed, several studies have shown that secretion of IL-4 was essential to the activity of Th3 [64, 65]. Our data also showed an early decrease of IL-2 secretion by HCV-inoculated Tconv, suggesting a decrease of the cell proliferation. This hypothesis is supported by data from the literature suggesting that iTreg (especially Tr1) are anergic *in vitro* and this could *be* due to the decrease secretion of IL-2 cytokine and/or the autocrine effect of secreted IL-10 [67]. Taken together, our study strongly suggests that HCV inoculation could directly generate induced regulatory T cells able to secrete immunosuppressive factors which could inhibit the immune response.

Interestingly, our results also showed an increased secretion of inflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-17 by HCV-inoculated Tconv. This data is correlated with the publication of Kondo, Y., et al, that describes the increase of IL-17 secreting T cells frequency in the liver of chronic HCV+ patients [68], and this strongly suggest that only a few percentage of Tconv cells are converted into regulatory T cells .

5. CONCLUSION

In conclusion, our study confirmed that the impact of HCV on human CD4+ conventional T cells induced the development of an inflammatory anti-viral response. Interestingly, this report also demonstrated that conventional CD4+ T lymphocytes inoculated by HCV may partially favor the emergence of regulatory T cells that exhibit suppressive activity. We stated that these induced Treg cells may lead to promote the immunosuppressive environment observed in HCV infected patients. This may also explain the escape of the virus from the immune system and thus the progression of hepatitis C to cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Acknowledgments: This work received the financial support from the “Institut Pasteur de Lille” and the Nord-Pas-de Calais Region. This work was also supported by SIRIC ONCOLille; Biology Institute of Lille (IBL); Univ. Lille ; Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites (ANRS), La ligue contre le cancer, Fondation ARC pour la recherche sur le cancer and Association Française pour l’Etude du Foie (AFEF). We thank Dr Mrizak Dhafer, Mustapha Rami for useful discussions.

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

1. Lavanchy, D., *Evolving epidemiology of hepatitis C virus*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(2): p. 107-15.
2. Abdel-Hakeem, M.S. and N.H. Shoukry, *Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 274.
3. Horner, S.M. and M. Gale, Jr., *Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus*. Nat Med, 2013. **19**(7): p. 879-88.
4. Sarhan, M.A., et al., *Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 3723-35.
5. Pawlotsky, J.M., [*Hepatitis C virus and immune response*]. Gastroenterol Clin Biol, 2001. **25**(4 Suppl): p. B123-33.
6. Heim, M.H. and R. Thimme, *Innate and adaptive immune responses in HCV infections*. J Hepatol, 2014. **61**(1 Suppl): p. S14-25.
7. Spaan, M., et al., *CD4+ CXCR5+ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses*. J Hepatol, 2014. **62**(2): p. 303-10.
8. Barathan, M., et al., *Chronic hepatitis C virus infection triggers spontaneous differential expression of biosignatures associated with T cell exhaustion and apoptosis signaling in peripheral blood mononucleocytes*. Apoptosis, 2015. **20**(4): p. 466-80.
9. Gerlach, J.T., et al., *Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins*. J Virol, 2005. **79**(19): p. 12425-33.
10. Cusick, M.F., et al., *Naturally occurring CD4+ T-cell epitope variants act as altered peptide ligands leading to impaired helper T-cell responses in hepatitis C virus infection*. Hum Immunol, 2011. **72**(5): p. 379-85.
11. Rosen, H.R., et al., *Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages*. Hepatology, 2002. **35**(1): p. 190-8.
12. Anderson, J.P., et al., *CD4 recovery on antiretroviral therapy is associated with decreased progression to liver disease among hepatitis C virus-infected injecting drug users*. Open Forum Infect Dis, 2015. **2**(1): p. ofv019.
13. Bertolotti, A., et al., *Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections*. Gastroenterology, 1997. **112**(1): p. 193-9.
14. Cooper, S., et al., *Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 439-49.
15. Vanis, N., A. Mehmedovic, and R. Mesihovic, *Use of serum levels of proinflammatory cytokine IL-1alpha in chronic hepatitis C*. Coll Antropol, 2015. **39**(1): p. 75-9.
16. Pimentel, J.P., et al., *Anti-inflammatory/regulatory cytokine microenvironment mediated by IL-4 and IL-10 coordinates the immune response in hemophilia A patients infected chronically with hepatitis C virus*. J Med Virol, 2013. **85**(6): p. 1009-18.
17. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 4-12.
18. Thakur, R., et al., *Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells?* Front Microbiol, 2015. **6**: p. 429.
19. Ulrich, P.P., et al., *Detection, semiquantitation, and genetic variation in hepatitis C virus sequences amplified from the plasma of blood donors with elevated alanine aminotransferase*. J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1609-14.
20. Everson, G.T., et al., *A randomized controlled trial of pretransplant antiviral therapy to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation*. Hepatology, 2013. **57**(5): p. 1752-62.

21. Napoli, J., et al., *Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines*. Hepatology, 1996. **24**(4): p. 759-65.
22. Ouaguia, L., et al., *Control of the inflammatory response mechanisms mediated by natural and induced regulatory T-cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-associated cancers*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 564296.
23. Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara, *Regulatory T cells - a brief history and perspective*. Eur J Immunol, 2007. **37** Suppl 1: p. S116-23.
24. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
25. Gol-Ara, M., et al., *The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis, 2012. **2012**: p. 805875.
26. Abbas, A.K., et al., *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. Nat Immunol, 2013 **14**(4): p. 307-8.
27. Zeng, H., et al., *Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance*. Cell Mol Immunol, 2015.
28. Zhang, X., et al., *CD4(+)CD62L(+) central memory T cells can be converted to Foxp3(+) T cells*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77322.
29. Cottrez, F. and H. Groux, *Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells*. Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): p. S12-5.
30. Bergmann, C., et al., *Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(9): p. 1429-42.
31. Peterson, R.A., *Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression*. Toxicol Pathol, 2012. **40**(2): p. 186-204.
32. Fabien, S., et al., *CD49b, a major marker of regulatory T-cells type 1, predicts the response to antiviral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation*. Biomed Res Int, 2013. **2014**: p. 290878.
33. Gagliani, N., et al., *Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells*. Nat Med, 2013. **19**(6): p. 739-46.
34. Bacchetta, R., et al., *High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 493-502.
35. Ouaguia, L., et al., *Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma*. ISRN Hepatology, 2013. **2013**: p. 564296.
36. Carpentier, A., et al., *Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation*. Am J Transplant, 2009. **9**(9): p. 2102-12.
37. Hall, C.H., et al., *HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12154.
38. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
39. Fabien, S., et al., *CD49b, a major marker of regulatory T-cells type 1, predicts the response to antiviral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 290878.
40. Delhem, N., et al., *[Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression]*. Bull Cancer, 2008. **95**(11): p. 1029-38.
41. Bolacchi, F., et al., *Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(2): p. 188-96.
42. MacDonald, A.J., et al., *CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons*. J Infect Dis, 2002. **185**(6): p. 720-7.
43. Cusick, M.F., et al., *Hepatitis C virus induces regulatory T cells by naturally occurring viral variants to suppress T cell responses*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 806061.

44. Cabrera, R., et al., *An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection*. *Hepatology*, 2004. **40**(5): p. 1062-71.
45. Dolganiuc, A., et al., *Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(6): p. 2119-27.
46. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. *J Exp Med*, 1998. **188**(2): p. 287-96.
47. Hougardy, J.M., et al., *In vitro expansion of CD4+CD25highFOXP3+CD127low/- regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy Mycobacterium tuberculosis-infected humans*. *Microbes Infect*, 2007. **9**(11): p. 1325-32.
48. Ndhlovu, L.C., et al., *FOXP3 expressing CD127lo CD4+ T cells inversely correlate with CD38+ CD8+ T cell activation levels in primary HIV-1 infection*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(2): p. 254-62.
49. Wu, X., et al., *T cell-extrinsic CD18 attenuates antigen-dependent CD4+ T cell activation in vivo*. *J Immunol*, 2015. **194**(9): p. 4122-9.
50. Levine, B.L., et al., *Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells*. *J Immunol*, 1997. **159**(12): p. 5921-30.
51. Jin, X., et al., *Large-scale in vitro expansion of human regulatory T cells with potent xenoantigen-specific suppression*. *Cytotechnology*, 2015.
52. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 329-41.
53. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
54. Whiteside, T.L., *Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression?* *Cancer Immunol Immunother*, 2014. **63**(1): p. 67-72.
55. Vasanthakumar, A. and A. Kallies, *IL-27 paves different roads to Tr1*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(4): p. 882-5.
56. Jiang, Z., et al., *Hepatic stellate cells promote immunotolerance following orthotopic liver transplantation in rats via induction of T cell apoptosis and regulation of Th2/Th3-like cell cytokine production*. *Exp Ther Med*, 2013. **5**(1): p. 165-169.
57. Silva-Campa, E., et al., *Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *Virology*, 2009. **387**(2): p. 373-9.
58. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 303-10.
59. Fedoseeva, N.V., et al., *[Features of proliferative response of T-cells on hepatitis c virus antigens in healthy individuals contacting with this virus]*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 2013(3): p. 38-44.
60. Dominguez-Villar, M., et al., *Up-regulation of FOXP3 and induction of suppressive function in CD4+ Jurkat T-cells expressing hepatitis C virus core protein*. *Clin Sci (Lond)*, 2012. **123**(1): p. 15-27.
61. Fernandez-Ponce, C., et al., *CD4+ primary T cells expressing HCV-core protein upregulate Foxp3 and IL-10, suppressing CD4 and CD8 T cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e85191.
62. Strauss, L., C. Bergmann, and T.L. Whiteside, *Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis*. *J Immunol*, 2009. **182**(3): p. 1469-80.
63. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 523-32.
64. Sumitomo, S., et al., *Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF-beta1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo*. *J Immunol*, 2013. **191**(5): p. 2351-9.
65. Inobe, J., et al., *IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(9): p. 2780-90.
66. Delhem, N., et al., *[Regulatory T-cells and hepatocellular carcinoma: implication of the regulatory T lymphocytes in the control of the immune response]*. *Bull Cancer*, 2008. **95**(12): p. 1219-25.

67. Pletinckx, K., et al., *Immature dendritic cells convert anergic nonregulatory T cells into Foxp3- IL-10+ regulatory T cells by engaging CD28 and CTLA-4*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(2): p. 480-91.
68. Kondo, Y., et al., *HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98521.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Phenotypic characterization of freshly isolated conventional T cells (Tconv). Representative *dot plot* of triple stained CD4+CD25^{-/low}CD127, CD4+LAG3-CD49b- and CD4+CD18^{high}CD49b- Tconv cells after magnetic bead-isolation of 4 independent experiments. **(A)** Representative dot plot of isolated Tconv exhibiting the cell granularity (SSC) and the cell size (FSC) for a grouped population of 97%. **(B)** Based on CD4, CD25 and CD127 protein expressions, the *lower-right quadrant* of the first dot plot indicates the percentage of CD4⁺CD25⁻ Tconv cells which is superior to 91% and more than 95% of these freshly isolated Tconv cells are CD25^{-/low}CD127⁺ (next plot, *right quadrants*). **(C)** Based on CD4, LAG3 and CD49b protein expressions, the *lower-right quadrant* of the first dot plot indicates the percentage of CD4+LAG3- Tconv cells which is superior to 94% and more than 97% of these Tconv cells are also CD49b-LAG3- (next plot, *lower left quadrant*). **(D)** The upper-left quadrant of the last plot also indicated that more than 99% of those Tconv were CD18^{high}CD49b-.

Figure 2. HCV inoculation modifies the Tconv gene expression pattern in favor of a regulatory gene expression profile. Isolated Tconv were cultured in activated conditions consisting of plate-bound anti-human CD3 mAb (1µg/mL) and soluble mouse anti-human CD28 mAb (100ng/mL) in the presence or in the absence of HCVcc. HCV inoculation modifies CD4, CD25, CD127(IL7RA), FOXP3, CD18, CD49B, LAG3, CTLA4 and PD1 expression in Tconv cells at 3 hours post-inoculation (3H p.i) **(A)**, 24H p.i **(B)**, 48H p.i **(C)** and 72H p.i **(D)**. Results are presented as means of duplicates of at least 4 independent experiments of HCV inoculated Tconv (*light grey bars*) versus non-inoculated Tconv (*dark bars*). Gene expressions are normalized by using GADPH, β-actin, 18s, Ubiquitine and HRPT mRNA as housekeeping-genes and result are expressed in fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ± standard error of the mean (SEM) bars.

Figure 3. HCV-inoculated Tconv cells acquire the CD49b+LAG3+ Tr1 regulatory phenotype. Proteomic experiments by FACS were performed to evaluate the impact of HCV inoculation on the emergence of iTreg from Tconv. Percentage expression (%) of CD4+CD25+ T cells frequency was quantified between Tconv cells post HCV inoculation (*black lines*) versus non inoculated Tconv (*light grey bars*) at 3, 24, 48 and 72H p.i **(A)**. By the same manner, percentage expression (%) of CD25^{high}CD127- **(B)**, CD4+CD18+ **(C)** and LAG3+CD49B+ **(D)** T cell subsets were also quantify between Tconv cells post HCV inoculation (black lines) vs non

inoculated Tconv (light grey lines) at different times point. Results are expressed as means of percentage of the double stained population of at least 3 independent experiments.

Figure 4. HCV-inoculated Tconv cells acquire an immunosuppressive property. Tconv were previously culture for 48h with or without HCV and then washed before added to PBMC culture. The ability of HCV inoculated Tconv to suppress PBMC proliferation was addressed by using a model of lymphocyte reaction (MLR) by co-culture of autologous PBMC and Tconv cells in activated conditions at ratio 4PBMC for 4Tconv (4:4) **(A)**, 4:3 **(B)**, 4:2 **(C)** and 4:1 **(D)**. PBMC and Tconv cells proliferation was measured after 48h by adding [³H]-thymidin during the last 18 hours. These experiments are expressed as mean of cpm values of quadruplicate ± SEM bars.

Figure 5. HCV-inoculated Tconv cells up-regulate the expression of genes related to iTreg activity. Tconv cells were incubated or not with HCV in activated conditions. Analyses reveal that HCV inoculation decrease the mRNA level expression of IL-2 and increase the mRNA level expression of IL-4, IL-10, TGF-β1, TGF-β3, IL12A (IL-35 sub-unit), EBI3 (IL-35 sub-unit), PD1 (PDCD1), Granzyme B (GZMB) and IFNγ (IFNG) in Tconv cells at 3H p.i **(A)**, 24H p.i **(B)**, 48H p.i **(C)** and 72H p.i **(D)**. Results are presented as means of duplicates of at least 4 independent experiments of HCV inoculated Tconv (*light grey bars*) versus non-inoculated Tconv (*dark bars*). Gene expressions are normalized by using GADPH, β-actin, 18s, Ubiquitine and HRPT mRNA as housekeeping-genes and result are expressed in fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ± SEM bars.

Figure 6. HCV-inoculated Tconv cells modify their cytokine secretions in favor of a regulatory profile secretome. Tconv cells were handled in activated condition and were cultured in the presence or in the absence of HCV particles. Secretion of immunosuppressive cytokines IL-10 **(A)** and TGF-β1 **(B)** as well as immune modulatory cytokines IL-4 **(C)** and IL-2 **(D)** were investigated by ELISA assays. Results are expressed as mean of at least 5 independent experiment and presented in pg/mL ± SEM bars comparing secretion by HCV-inoculated Tconv cells (*light grey bars*) versus non-inoculated Tconv cells (*dark bars*).

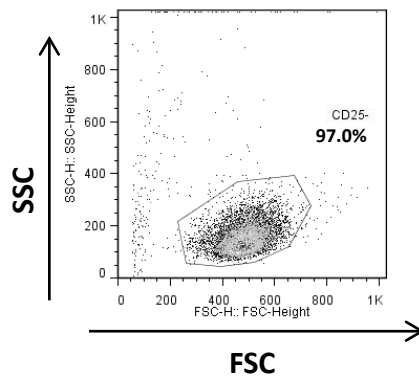
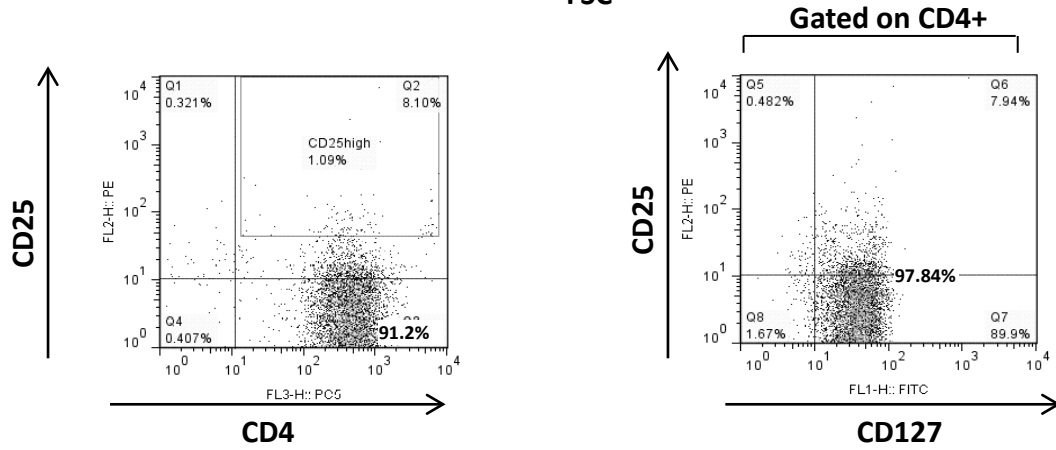
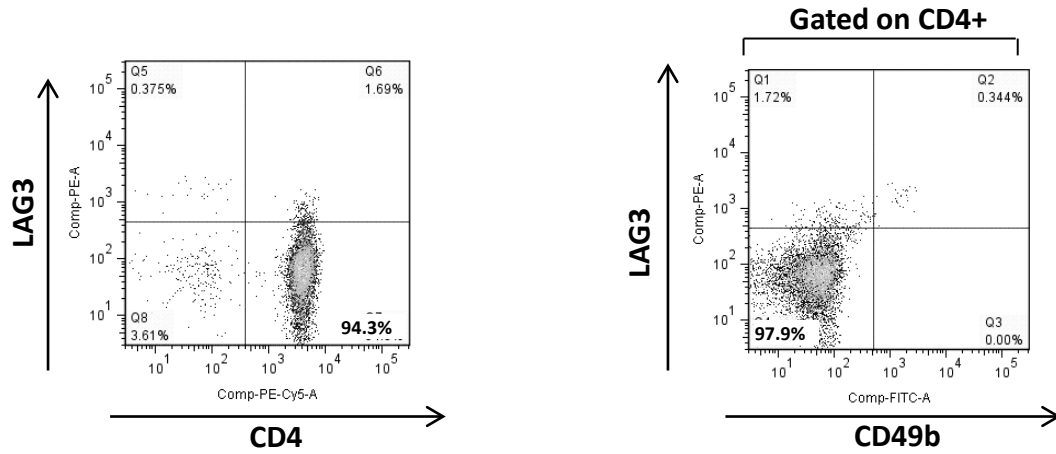
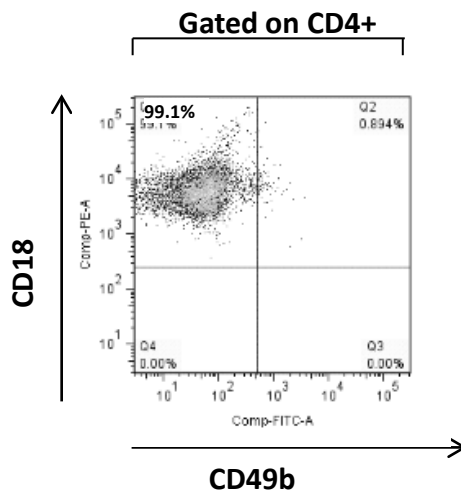
Figure 7. HCV-inoculated Tconv cells increase their secretion of IFNγ and IL-17 pro-inflammatory cytokines. Tconv cells were handled in activated condition and were cultured in the presence or in the absence of HCV particles. Secretion of pro-inflammatory cytokines IFNγ **(A)** and IL-17 **(B)** were investigated by ELISA assays. Results are expressed as mean of at least 9 and 3 independent experiment respectively. Data are presented in pg/mL ± SEM bars comparing secretion by HCV-inoculated Tconv cells (*light grey bars*) versus non-inoculated Tconv cells (*dark bars*).

Table I: Primers Sequences

Gene	primer sequences			
hCD4	Forward	GGGAAATCAGGGCTCCTTCTTA	Reverse	TGGTCCCAAAGGCTTCTTCTT
hCD25 (IL2RA)	Forward	GGGACTGCTCACGTTTCATCA	Reverse	TTCAACATGGTTCCTTCTTGTAG
hCD127 (IL7RA)	Forward	GCAAGATACGTTTCTCAGCAAC	Reverse	TCCAAAGCTTTCTGGAGTGATGA
hFOXP3	Forward	TCACCTACGCCACGGTCA	Reverse	CACAAAGCACTTGTGCAG
hCTLAT4	Forward	TTCTTCTTTCATCCCTGTCTTCT	Reverse	GAGATGCATACTCACACACAAAGCT
CD18	Forward	ATGCTTGATGACCTCCAGGAAATGT	Reverse	ACGGTCTTGTCCACGAAGGA
CD49b	Forward	CAACGGGTGTGTGTTCTGACA	Reverse	TCATCACACACAACCACAACAT
hLAG3	Forward	TGGCTTCAACGTCTCCATCA	Reverse	CCCACCTGGAACCTGCT
hCTLA4	Forward	TTCTTCTTTCATCCCTGTCTTCTG	Reverse	GAGATGCATACTCACACACAA
BLIMP1 (PRDM1)	Forward	GACGGGGTACTTCTGTTC	Reverse	GGCATTCTTGGGAAGTGTGT
GITR (TNFRSF18)	Forward	TGTGTCCAGCTGAATTCCA	Reverse	CCGAGGCACAGTCGATACACT
OX40 (TNFRSF4)	Forward	ACGACGTGGTCAGCTCCAA	Reverse	AGCGGCAGACTGTGTCTG
CD39 (ENTPD1)	Forward	CCATTCATTGGCAAGATCC	Reverse	AGGTGGAGTGGGAGAGAGGT
CD73 (NT5E)	Forward	CAAAGAGGCCAAATTTCCAA	Reverse	TTCCACAACCTTCATACCA
hIL2	Forward	ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTAC	Reverse	TCCAGAGGTTTGAGTTCTTCTTAGA
hIL4	Forward	CACAAGCAGCTGATCCGATTC	Reverse	TTCCAAGAAGTTTTCCAACGTACTC
hIL10	Forward	GAGAACCAAGACCCAGACATCAA	Reverse	CCACGCCTTGCTCTTGT
hTGF β 1	Forward	CGAGCCTGAGGCCGACTAC	Reverse	CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA
hTGF β 3	Forward	CGGAATGAGCAGAGGATCGA	Reverse	CCGTGTGGGCAGATTCTTG
hIL12A (IL12p35)	Forward	CCTTACCACCTCCAAAACCT	Reverse	TGGTAAACAGGCCTCCACTGT
hEBI3	Forward	CCCCGCCACTGCCACAATGA	Reverse	GCCCTCCAACAGGTGTCCCG
PD1 (PDCD1)	Forward	GCTACAACCTGGGCTGGCG	Reverse	ATGTGTTGGAGAAGCTGCAGGT
hGZMA	Forward	ATTGCAAAAGACTGGGTGTTGAC	Reverse	TGGCTCTTCCCTGGTTATTGA
hGZMB	Forward	CGCCCCTACATGGCTTATCTT	Reverse	CCCCAAGGTGACATTTATGG
hIFN γ (IFNG)	Forward	ATGTAGCGGATAATGGAATC	Reverse	GACATTCAAGTCAGTTACC
h β -actine	Forward	CACGGCATCGTCACCAACT	Reverse	GCCTGCTTACCACCTTCTTGATGC
hGAPDH	Forward	GCCAAGGTCATCCATGACAACCTTGG	Reverse	GCCTGCTTACCACCTTCTTGATGC
hHRPT	Forward	CCCTGGCGTCGTGATTAG	Reverse	ATGGCCTCCCATCTCCTT
hUBI	Forward	CCGACCACAGTGGCTATGC	Reverse	CCTCTTTAATATCTCCAGGCTTGA
h18S	Forward	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	Reverse	GGACATCTAAGGGCATCACA

LEGEND OF SUPPLEMENTARY FIGURE

Figure S1. HCV inoculation modifies Tconv phenotype and activity. Tconv cells were incubated or not with HCV in activated conditions. HCV inoculation increase the mRNA level expression of FOXP3 **(A)** and IL-10, GZMB **(B)** in Tconv cells at 96H p.i. Results are presented as means of duplicates of 3 independent experiments of HCV inoculated Tconv (*light grey bars*) versus non-inoculated Tconv (*dark bars*). Gene expressions are normalized using GAPDH, β -actin, 18s, Ubiquitine and HRPT mRNA as housekeeping-genes and result are expressed in fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm SEM bars. The ability of HCV-inoculated Tconv to suppress PBMC proliferation was evaluated using a model of lymphocyte reaction (MLR) by co-culture of autologous PBMC and Tconv cells in activated conditions at ratio 4 PBMC for 4 Tconv (4:4), 4:3 , 4:2 and 4:1 **(C)**. PBMC and Tconv cells proliferation were measured after 48h by adding [3 H]-thymidin during the last 18 hours. These experiments are expressed as mean of cpm values of quadruplicate \pm SEM bars.

A**B****C****D****Figure 1**

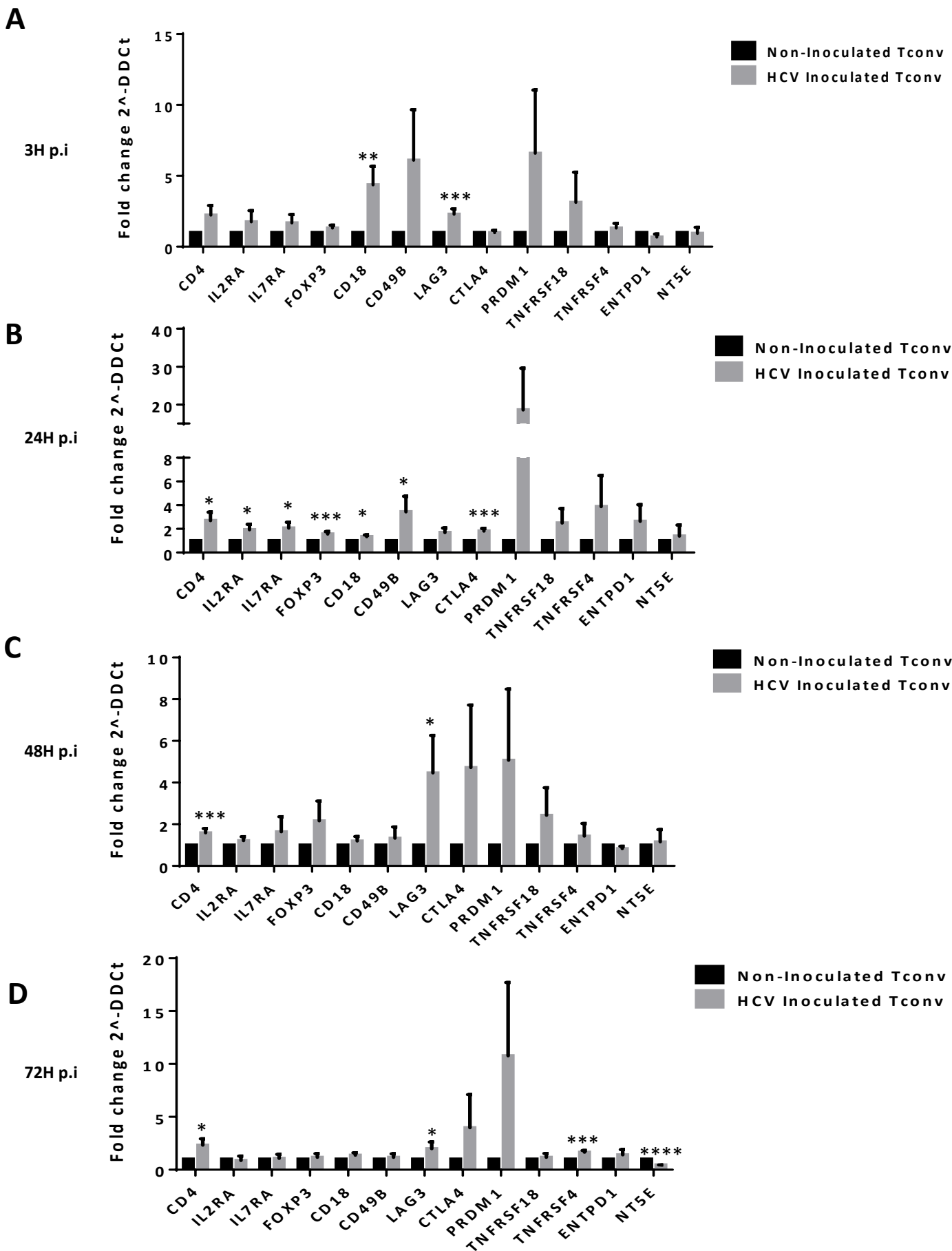


Figure 2

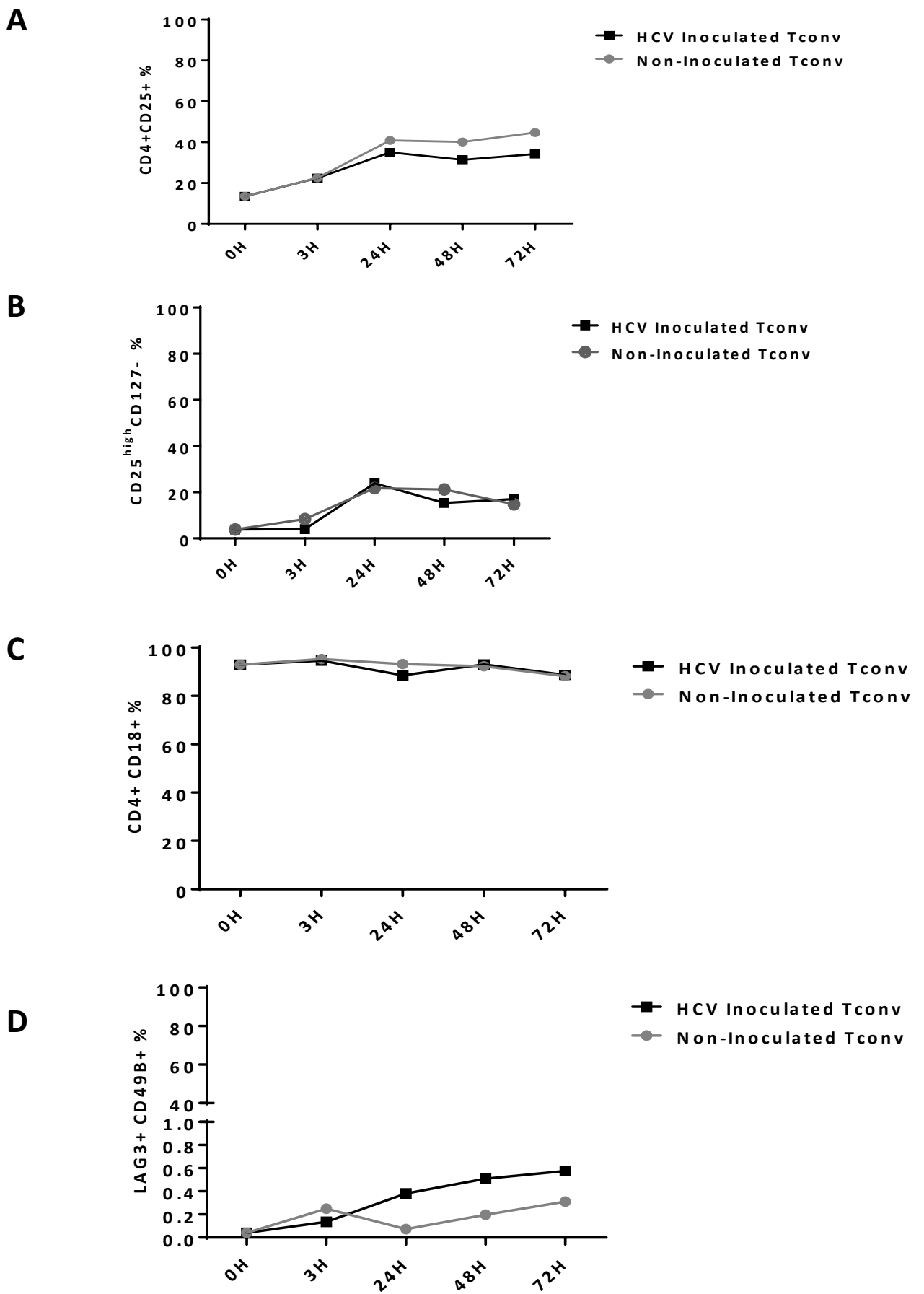


Figure 3

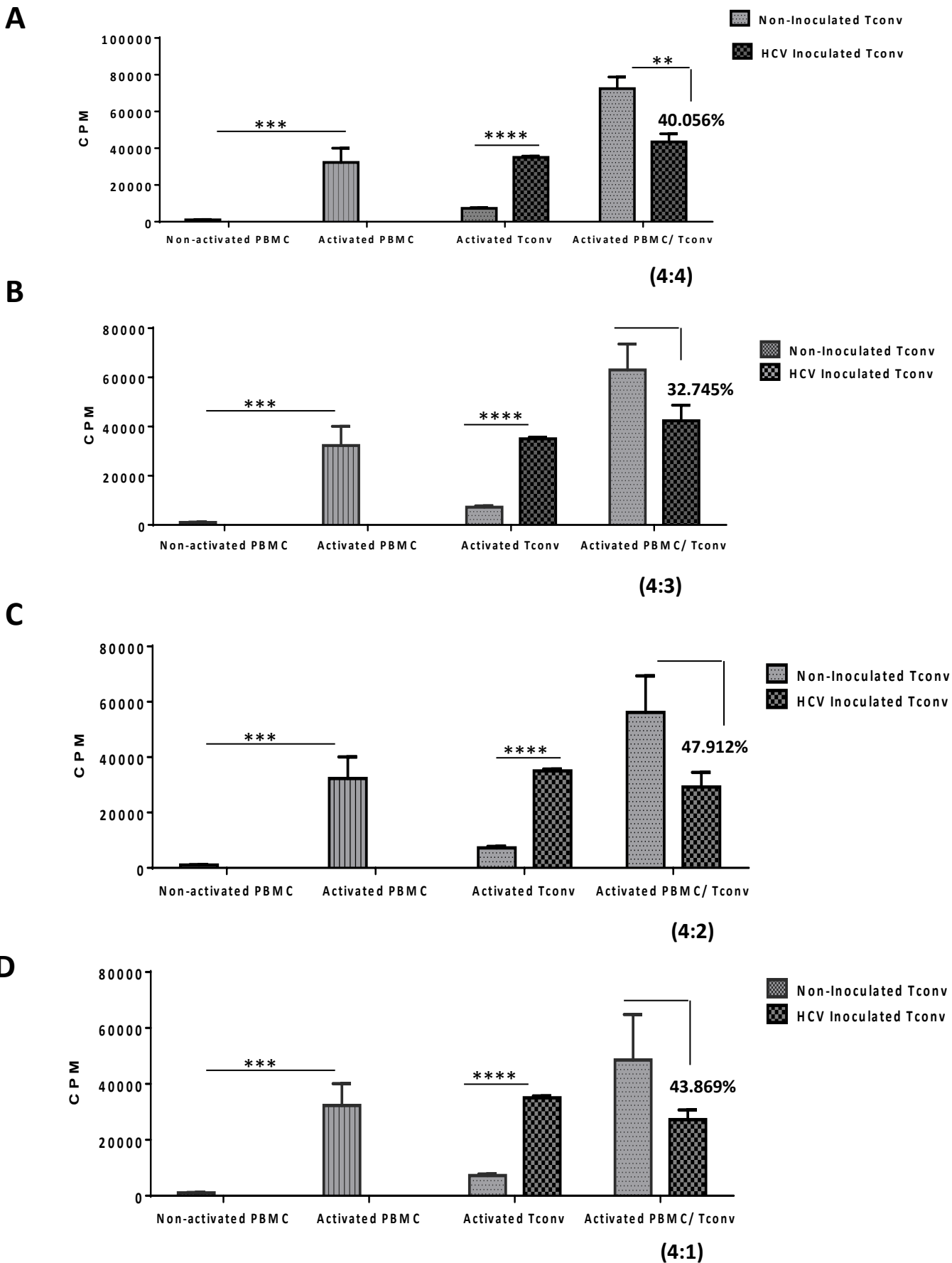


Figure 4

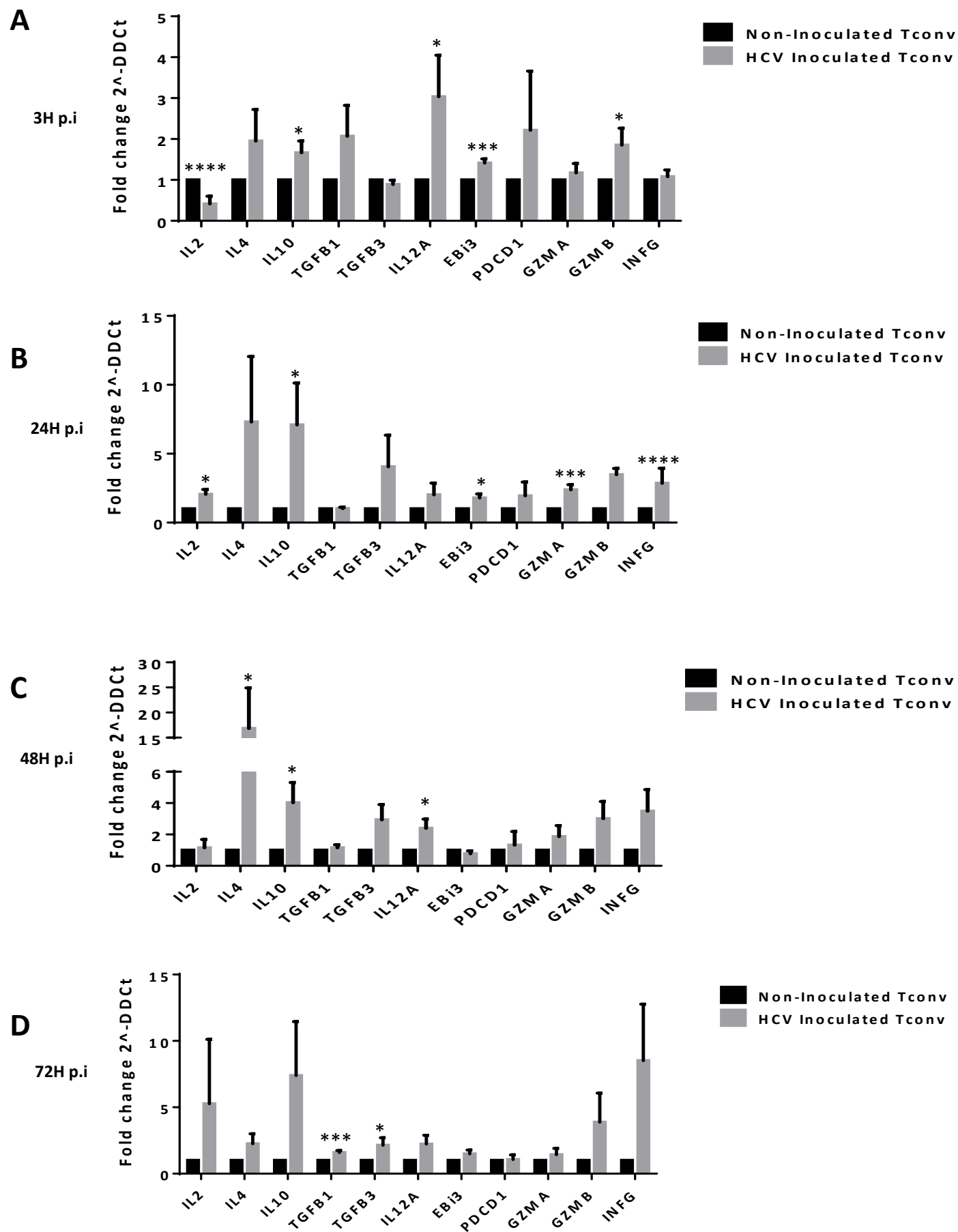


Figure 5

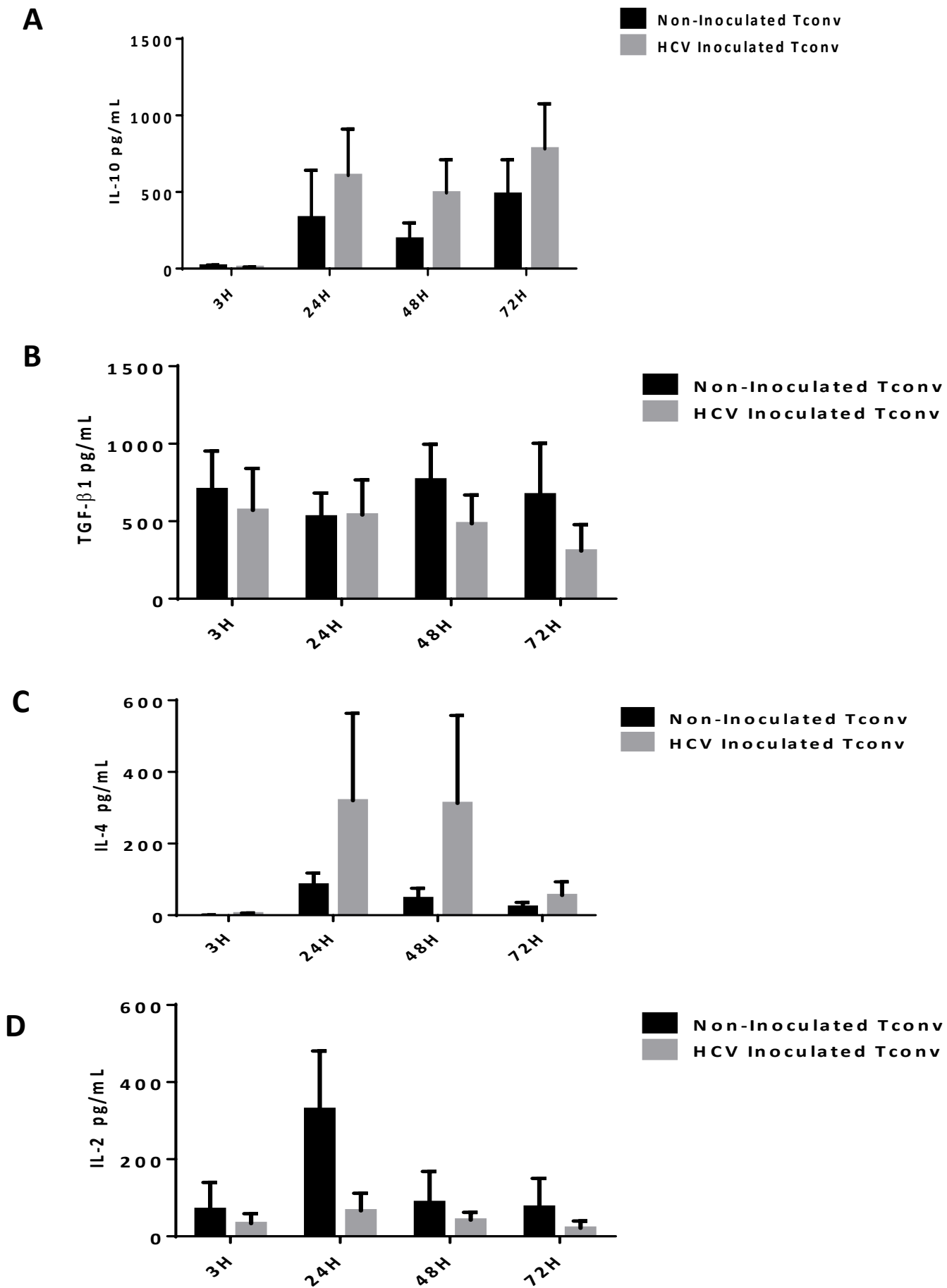
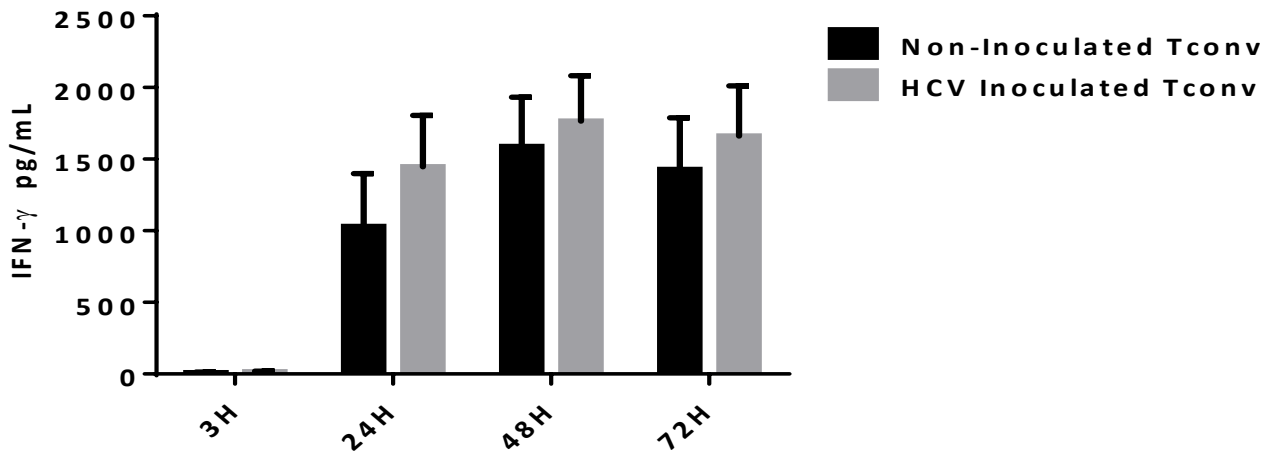


Figure 6

A



B

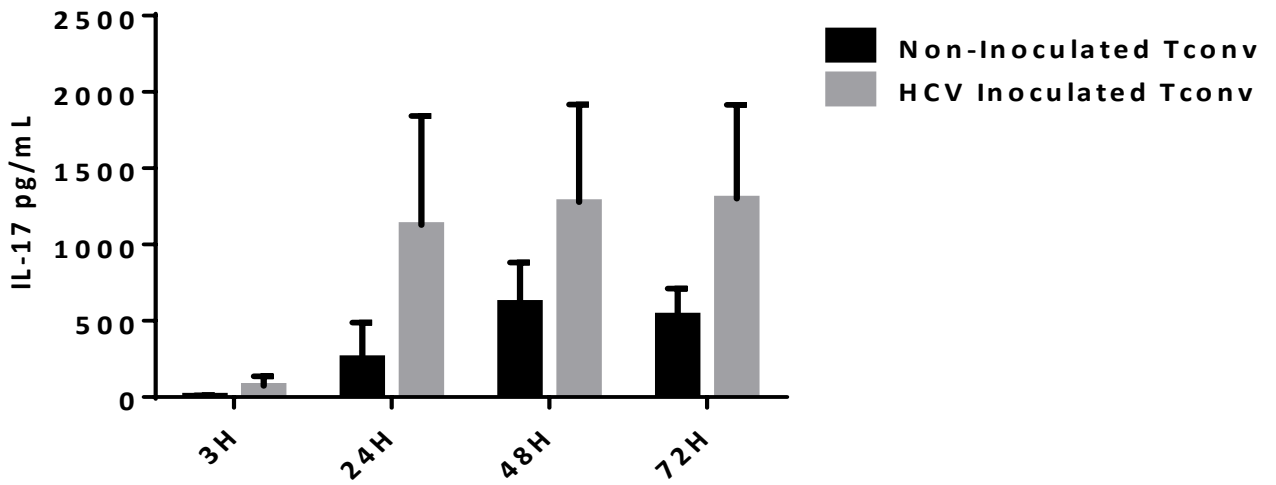
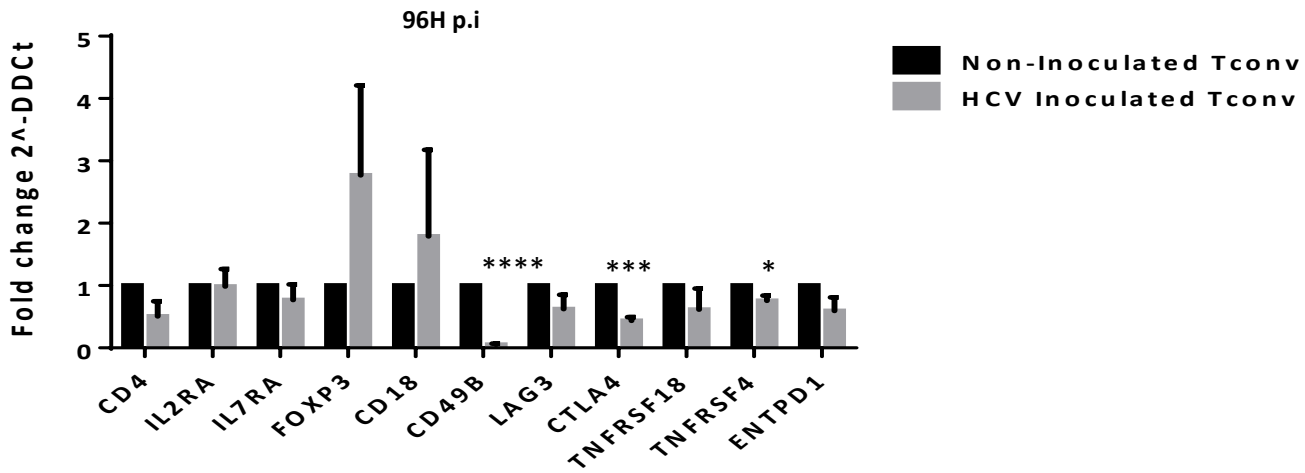
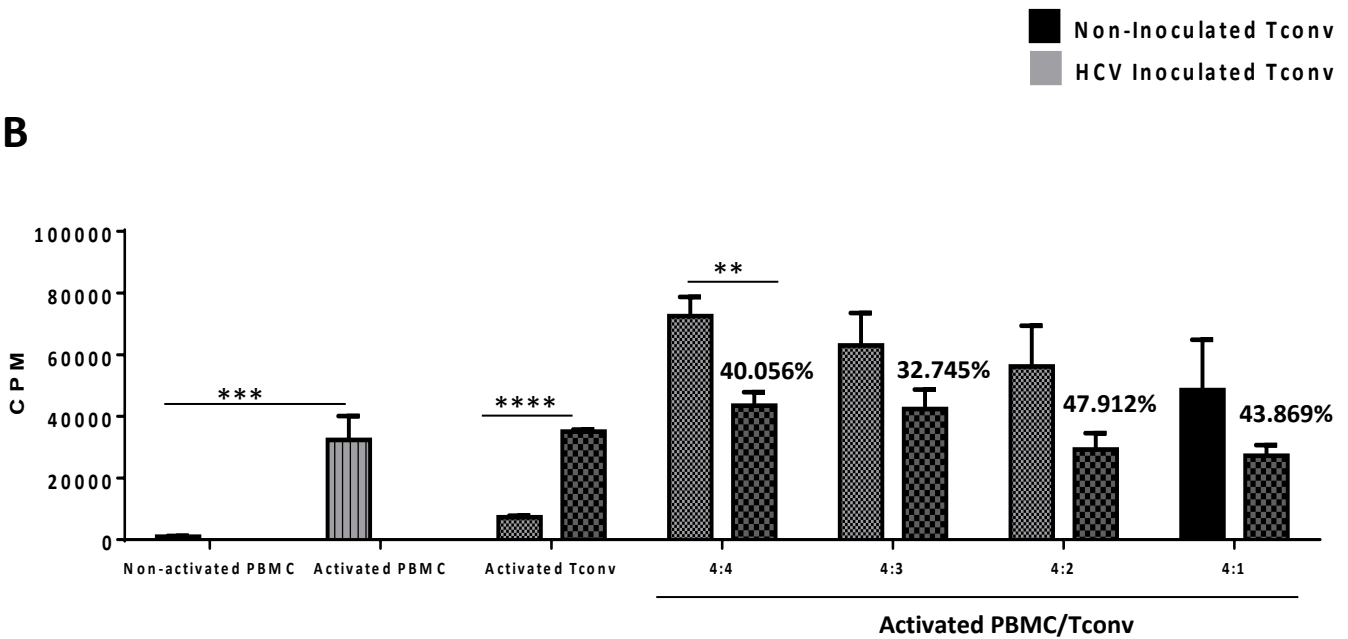
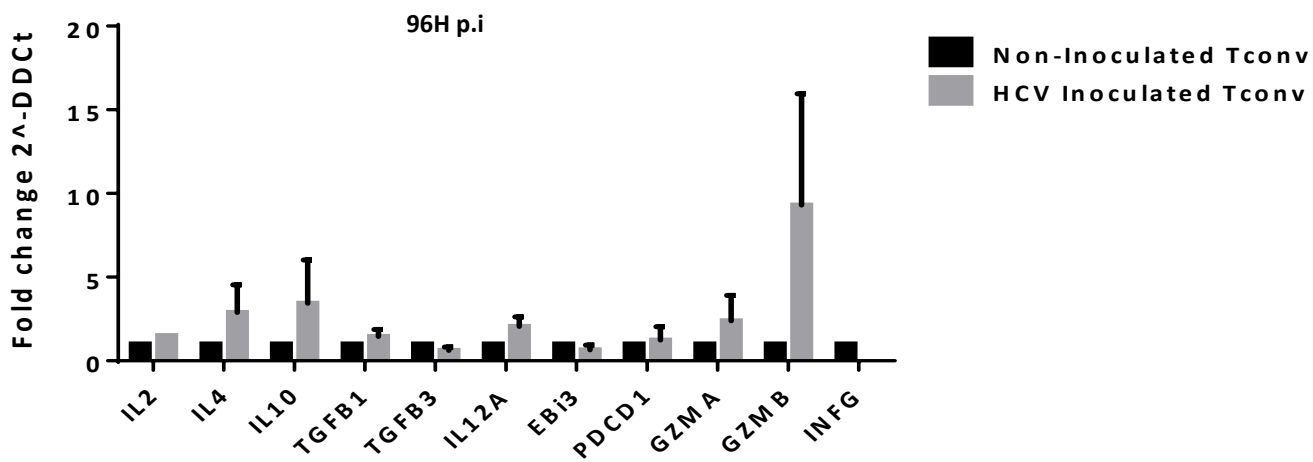


Figure 7

A**B****C****Figure S1**

DISCUSSION-CONCLUSION

L'hépatite C est un problème de santé publique qui touche près de 2.3% de la population à travers le monde [20]. De nombreuses études ont montré que la principale cellule hôte du virus de l'hépatite C (VHC) est l'hépatocyte [501, 576]. L'infection par le VHC conduit à une sécrétion importante des cytokines anti-virales IFN- γ , IFN- α et IFN- β , induisant la transcription de nombreux ISGs (interférons stimulating genes) [411]. Il se met alors en place, successivement, une réponse immunitaire innée médiée par les macrophages, cellules dendritiques, cellules de Kupffer et cellules NK puis une réponse adaptative médiée par les lymphocytes B, lymphocytes NKT, lymphocytes T $\gamma\delta$, lymphocytes TCD8+ et lymphocytes TCD4+ qui sont les acteurs majeurs de la réponse anti-virale [501]. Ces réponses sont mises en place par le système immunitaire de l'hôte dans l'optique d'instaurer un environnement anti-viral pouvant limiter la dispersion du virus et favoriser la guérison. Cependant, chez environ 80% des patients, malgré le développement des réponses immunitaires innées et adaptatives, l'hépatite C va évoluer vers la chronicité, donnant chez certains patients un carcinome hépatocellulaire [32]. De nombreux travaux ont montré que cette chronicité était due, à la fois, à des caractéristiques virologiques multi-spécifiques et à l'altération de la réponse immunitaire. Ainsi, l'hépatite C chronique est caractérisée par le développement d'une réponse immunitaire innée et adaptative à la fois au niveau intra-hépatique et en périphérie [411], qui est cependant incapable de contrôler la réplication virale ni de conduire à l'élimination du virus [506].

Une des explications avancées pour expliquer la chronicité de la maladie, est que le VHC va développer de nombreuses stratégies d'échappement et qu'il est capable d'interagir avec les cellules de l'immunité pour inhiber leur activité anti-virale. En effet, des études ont montré que les protéines virales E1 et E2 pouvaient interagir avec les molécules de signalisation PKR (protéine kinase ARN-dépendante) afin d'inhiber les effets de l'interféron [153]. D'autres études ont montré que la protéine de la capsid virale (Core) avait la capacité d'interagir avec le récepteur gC1qR pour inhiber la prolifération des cellules immunitaires [132]. Par ailleurs, des travaux ont suggéré que le complexe protéique NS3/4A du VHC pouvait se fixer aux récepteurs de l'immunité TLR-2 et TLR-1/6, cliver TRIF et CARDIF et inhiber la production d'IFN [184, 501]. Enfin, des études plus récentes ont montré que les protéines NS5A du VHC pouvait moduler la réponse immunitaire en interagissant avec la protéine adaptatrice MyD88, en inhibant la signalisation cellulaire médiée par les TLR- et en inhibant, *in vitro*, la sécrétion de cytokines anti-virales [219, 220]. Ainsi, malgré le développement d'une réponse immunitaire anti-virale, le virus de l'hépatite C pourra persister dans

l'organisme. Par ailleurs, de nombreux travaux ont montré que l'activation d'une réponse antivirale pro-inflammatoire pendant la phase chronique de l'infection était associée au développement de lésions hépatiques [506]. Ainsi, les mécanismes de la persistance virale sont donc principalement ceux de l'échec des réponses immunes à contrôler la réplication du virus et sa propagation.

Une autre explication de la persistance du VHC et de l'aggravation de la maladie serait la présence de lymphocytes T régulateurs naturel (nTreg ou Treg) et induits (iTreg) qui favoriseraient l'environnement immunosuppresseur et la progression de la maladie [610, 611]. En effet, les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'infection chronique par le VHC. Ce rôle a été suggéré pour la première fois en 2003 lorsque certaines études ont décrit un nombre important de Treg dans le foie et dans le sang de patients chroniquement infectés comparés aux sujets sains ou comparés aux patients en voie de guérison spontanée [866, 867]. De plus, les travaux de notre équipe ont montré que les lymphocytes Treg et iTreg pouvaient contribuer à la progression de la maladie [610, 611]. Par ailleurs, des travaux de la littérature ont décrit une augmentation des Treg FOXP3+ chez les patients VHC+ [868, 869], suggérant également une augmentation de la fréquence des Treg chez les patients VHC+.

Cette hypothèse a été confirmée dans la première partie de mon travail (article 1). En effet, nous avons pu obtenir trois biopsies d'un patient chroniquement infecté par le VHC de génotype 1b, pour une étude rétrospective longitudinale. La première biopsie a été effectuée pendant la phase chronique de l'infection sur un foie ne présentant aucune lésion hépatique (B1). La seconde biopsie sur un foie montrant une évolution de la maladie et la présence de nodules cirrhotiques (B2) et la troisième biopsie sur un foie montrant une maladie hépatique très avancée et présentant un carcinome hépatocellulaire (B3). Grâce à ce matériel précieux, nous avons pu analyser l'évolution de la fréquence des différentes populations immunitaires au cours de l'aggravation de l'hépatite C.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression quantitative des marqueurs des différentes populations immunitaires du foie par RT-Q-PCR. Nos résultats ont montré une augmentation du marqueur *CD19* au cours de la l'aggravation de la maladie. Ces résultats sont parfaitement en accord avec les données de la littérature qui montrent une activation des lymphocytes B en cas d'infection chronique par le VHC [891]. Nos résultats ont également montré une surexpression génique du *CD8 β* mais pas celle du *CD8 α* dans les échantillons B2 et B3. Ces résultats sont également confortés par la littérature qui fait mention d'une augmentation de l'infiltrat *CD8 β* dans le foie des patients VHC+ [892]. Nous avons également observé une augmentation significative de l'expression du *CD4*, proportionnelle à l'aggravation de la maladie. Ces résultats confirment les données de la littérature qui décrivent une réponse cellulaire TCD4+ spécifique du

VHC dans la circulation périphérique et dans les biopsies des patients VHC+ [592, 593]. Cependant, notre étude ne montre aucune modification significative de l'expression de l'*IL-2*, ni même celle de l'*IL-4* mais une diminution de l'*IFN-γ*, suggérant ainsi que les lymphocytes TCD4+ intra-hépatiques des stades avancés ne seraient principalement pas des cellules Th1 ni des cellules Th2. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que, dans cette étude, nos échantillons proviennent d'un patient présentant une chronicité déjà très avancée (plusieurs années après infection), ne permettant pas d'évaluer l'infiltrat lymphocytaire quelques mois post-infection. En effet, des travaux de la littérature ont montré que le profil cytokinique des TCD4+ était associé à l'évolution de la maladie. Ainsi, les cellules CD4+Th1 (sécrétrices d'*IL-1α*, *IFN-γ*, *IL-2* et *TNF-α*) ont été majoritairement retrouvés chez les patients VHC+ développant une guérison spontanée pendant la phase aiguë, tandis que les cellules CD4+Th2 (sécrétrices d'*IL-4*, *IL-5*) ont été retrouvés en abondance chez les patients VHC+ ayant une évolution chronique [602, 604]. Néanmoins, l'observation majeure de notre travail a été une augmentation significative de l'expression des marqueurs *CD4*, *CD25*, *T1-ST2*, *CCR-5* et *ICAM1* au cours de l'aggravation de la maladie. Ces données suggèrent qu'une grande partie de l'infiltrat hépatique des CD4+ est constituée de lymphocytes T régulateurs naturels CD4+CD25+. Par ailleurs, ces résultats confirment des travaux antérieurs de l'équipe qui ont décrits un recrutement important des lymphocytes T régulateurs naturels au cours de la progression de l'hépatite C [611].

De manière très intéressante, cette étude montre également une augmentation significative de l'expression des marqueurs phénotypiques *CD18 (ITGB2)*, *CD49B (ITGA2)* et une augmentation significative des marqueurs fonctionnels *IL-10* et *TGF-β1* au cours de la progression de la maladie, suggérant ainsi une augmentation de la fréquence intra-hépatique des lymphocytes T régulateurs induits de type 1 (Tr1). En effet, bien que d'autres cellules immunitaires puissent également sécréter les cytokines immunosuppressives *IL-10* et *TGF-β1*, l'absence de modification de l'expression des marqueurs *CD11c* (cellules dendritiques) tend à confirmer une présence d'*IL-10* principalement produite par les Tr1. Ces résultats sont en corrélation avec certaines données de la littérature qui ont décrit une augmentation de la fréquence des Tr1 chez les patients chroniquement infectés par le VHC [881]. De plus, des travaux antérieurs de l'équipe avaient déjà décrit une augmentation de la fréquence des Tr1 chez des patients présentant une récurrence de l'infection virale C après transplantation hépatique [90, 893]. L'ensemble de ces données suggèrent donc que les lymphocytes T régulateurs induits de type 1 (Tr1) pourraient servir de marqueur prédictif à l'aggravation et à la récurrence de l'hépatite C.

Mes travaux ont également montré une augmentation intra-hépatique de l'expression des récepteurs spécifiques de l'*IL-10 (IL-10Rα et IL-10Rβ)* et du *TGF-β1 (TGF-βR1 et TGF-βR2)*

suggérant l'existence d'une biodisponibilité à ces cytokines plus importante dans les foies cirrhotiques et tumoraux. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression du *TGF-β1* et de ses récepteurs laisse entrevoir la possible augmentation de la fréquence des lymphocytes T régulateurs induits Th3. En effet, de nombreuses études ont montré que les cellules régulatrices Th3 étaient les principales cellules sécrétrices de TGF-β1 dans le sang même si les Treg naturels et les Tr1 peuvent en sécréter de façon modérée. Cette hypothèse confirme les données de la littérature qui décrivent une augmentation des cellules CD4+TGF-β1+ chez les patients chroniques VHC+ [855, 894]. Nous savons que la cytokine TGF-β1 peut altérer la matrice extracellulaire et stimuler le développement de la fibrose chez les patients VHC+ [895]. Ainsi, dans notre étude, la détection du TGF-β1 uniquement au stade de cirrhose et de CHC, suggère une induction et/ou une aggravation des lésions hépatiques. De façon très intéressante, notre étude semble montrer que l'augmentation des ces populations régulatrices (Treg, Tr1 et Th3) est progressive et proportionnelle à l'évolution de l'histoire naturelle de l'hépatite C. Ainsi, l'augmentation d'*IL-10* et du *TGF-β1* associée à une diminution d'*IFN-γ* semblent indiquer une altération fonctionnelle des lymphocytes TCD4+ spécifiques et l'installation d'un environnement immunosuppresseur qui favoriserait l'aggravation vers le cancer du foie. *Cette étude a permis de confirmer l'installation d'un infiltrat lymphocytaire intra-hépatique de type régulateur, favorisant un microenvironnement immunosuppresseur propice à l'aggravation de la maladie. Cependant, l'impact spécifique de l'infection par le VHC sur ces lymphocytes T régulateurs ainsi que les mécanismes impliqués dans leur recrutement intra-hépatique demeuraient encore inconnus.*

Afin de répondre à cette interrogation, J'ai consacré une grande partie de ma thèse à étudier l'impact direct du virus de l'hépatite C (VHC) sur le phénotype et l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs naturels (Treg). Je me suis également intéressée aux mécanismes mis en jeu par les cellules du foie pour recruter les Treg (Article 2). Pour ce faire, J'ai réalisé des expériences *in vitro* de co-culture de Treg naturels CD4+CD25^{+high}CD127^{-low}, isolés de poches de sang et donneurs sains, avec des particules virales infectieuses du VHC (modèle VHCcc/JFH1).

Dans un premier temps, nous avons caractérisé phénotypiquement les cellules isolées de PBMC de donneurs sains. Les résultats ont montré que plus de 96% de la population des Treg exprimaient le phénotype CD4+CD25^{+high}CD127^{-low}. Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux de la littérature qui montrent que les lymphocytes TCD4+ régulateurs naturels sont caractérisés par l'expression constitutive de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) et par une sous-expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (CD127) [492, 717, 740]. Certaines études ont montré que l'activation des lymphocytes T conventionnels (CD4+CD25-) pouvait également conduire à une surexpression du marqueur CD25 [720]. Néanmoins, on peut clairement distinguer

les lymphocytes T conventionnel activés qui expriment transitoirement le CD25, des lymphocytes T régulateurs naturels qui l'expriment de manière constitutive, stable et à des niveaux très élevés (CD25^{high}) [720]. De plus, d'autres études ont clairement démontré que le marqueur CD127 permettait de discriminer les Treg CD4+CD25^{high} naturels n'expriment pas ou très peu le CD127 (CD127^{-low}), des lymphocytes T CD4+ conventionnels activés (CD4+CD25^{+/-}) qui expriment fortement le CD127 (CD127^{+high}) [740, 741]. Ainsi, malgré le fait que 5 à 10% des TCD4+ périphériques expriment le CD25, seuls les lymphocytes CD4+CD25^{high}, qui ne représentent que 2 à 5% des lymphocytes T CD4+, constitueraient les Treg [617, 721]. Nos travaux sont parfaitement en accord avec ces données de la littérature car ils montrent que plus de 95% des Treg isolés possèdent bien le phénotype CD4+CD25^{high}CD127^{-low} contrairement au T conventionnels qui sont majoritairement CD4+CD25-CD127+. De plus, nos résultats ont montré que les Treg isolés représentaient 0.2 à 1.5% des PBMC circulant et environ 2 à 7% des TCD4+ périphériques.

Nous avons également analysé l'expression protéique du facteur de transcription FOXP3 et nos résultats montrent que plus de 86% des Treg isolés sont FOXP3+. FOXP3 est un facteur de transcription essentiel dans le lignage Treg qui contrôle la fonction et l'homéostasie des Treg [734]. Ce marqueur a permis d'identifier clairement les Treg murins mais il ne serait pas le marqueur universel des Treg chez l'homme, en particulier depuis que son expression a été retrouvée dans les lymphocytes T conventionnels CD4+CD25- activés [736]. Par ailleurs, des travaux récents ont montré que les cellules humaines CD25-FOXP3+ ne possèdent pas d'activité régulatrice [737]. Nos travaux confirment les données de la littérature car ils montrent que près de 12% des T conventionnels (Tconv) expriment le FOXP3 contre 86% des Treg. De plus, tout comme mentionné dans la littérature, l'expression du FOXP3 dans les CD4+CD25- activés reste faible et transitoire comparée à celle des Treg. L'ensemble de nos résultats montrent donc que nos techniques d'isolement permettent d'obtenir des Treg naturels humains exprimant le phénotype régulateur attendu.

Cette étude a par la suite été complétée par la caractérisation fonctionnelle des Treg isolés. Ainsi, les Treg naturels ont également été caractérisés sur leur incapacité à proliférer *in vitro*, même en condition d'activation [616]. En effet, de nombreuses études *in vitro* ont montré qu'une forte costimulation avec des anticorps monoclonaux anti-CD28 et une stimulation mitogénique par l'anti-CD3 (court-circuitant le TCR) étaient incapables, seules, de lever l'état d'anergie des Treg, mais que l'utilisation de cytokines de prolifération, en particulier l'IL-2 recombinante, associée à une forte costimulation pouvait induire la prolifération des Treg naturels [710]. Nous avons réalisé des expériences de prolifération cellulaire par technique d'incorporation de thymidine tritiée sur les Treg activés et nos résultats confirment bien que les Treg naturels isolés sont incapables de

proliférer *in vitro*, même après une activation pendant 48H contrairement aux PBMC qui prolifèrent significativement après activation. Ces données montrent donc que les cellules que nous isolons *ex vivo* répondent bien au comportement anergique des Treg naturels humains.

Enfin, les lymphocytes T régulateurs sont aussi caractérisés par leur capacité à inhiber la réponse immune par divers mécanismes, tels que la sécrétion d'importantes quantités de cytokines immunosuppressives, l'inhibition de la fonction des cellules dendritiques, l'induction de la cytolysse et de la mort cellulaire par apoptose ou encore l'inhibition de la prolifération des cellules immunitaires [685]. Des expériences de co-cultures des Treg isolés avec des PBMC autologues ont été réalisées et les modifications de la prolifération des PBMC ont été évaluées. Nos résultats montrent que les Treg suppriment significativement la prolifération des PBMC activés et qu'ils induisent leur cytolysse de manière dose dépendante. Ces données sont en accord avec les travaux de la littérature montrant que les Treg peuvent supprimer la prolifération des cellules immunitaires et provoquer leur mort par apoptose [685]. L'ensemble de ces résultats montre que nous parvenons à isoler des Treg naturels humains qui sont parfaitement fonctionnels.

Après la caractérisation des Treg, notre première interrogation a été de déterminer si le virus de l'hépatite C pouvait infecter un lymphocyte T régulateur. En effet, bien que le VHC ait été considéré pendant longtemps comme essentiellement hépatotrope, de nombreuses études ont montré que le VHC était capable d'infecter et de se répliquer dans des cellules d'origine hématopoïétique comme les cellules lymphocytaires [261-264]. Selon certains travaux, le lymphotropisme du VHC représenterait même l'étape la plus importante dans la pathogénèse virale C [265, 266]. De plus, l'existence de corrélations entre les infections par le VHC et la présence de cryoglobulinémies mixtes associées au développement de lymphomes non-hodgkiniens a conforté l'hypothèse d'un tropisme extra-hépatique du VHC [267, 268]. Pour conforter ou infirmer cette hypothèse, nous avons évalué si les Treg fraîchement isolés pouvaient posséder les récepteurs et corécepteurs d'entrée du virus de l'hépatite C. Nos résultats montrent que les Treg naturels $CD4+CD25^{+high}CD127^{-low}$ expriment les récepteurs d'entrée CD81, CLDN1, LDLR, OCLN et EGFR, suggérant ainsi la possibilité d'une fixation du VHC sur les Treg. En effet, les données de la littérature décrivent, pour l'entrée du VHC dans les hépatocytes, un attachement des glycoprotéines virales E1 et E2 aux récepteurs membranaires de l'hôte dont les plus connus sont : la tétraspanine CD81 [279], le récepteur de lipoprotéines de basses densités (LDLR) [278], les protéines de jonctions serrées Claudine 1 (CLDN1) [279, 281] et occludine (OCLN) [282] et le récepteur tyrosine kinases EGFR [149]. Certains travaux ont d'ailleurs montré que la protéine LDLR était le principal récepteur associé à l'attachement du virus et que la présence des molécules CD81 et SCARB1 était essentielle à l'entrée du VHC dans les cellules hôtes [262]. Notre étude montre

également une expression des co-récepteurs *CD5*, *TLR-7* et *TLR-9* sur les Treg. Ce résultat contribue à étayer notre hypothèse dans la mesure où les données de la littérature décrivent les TLR-s comme co-facteurs d'entrée du VHC [136]. Et plus récemment, une étude a montré que le récepteur scavenger *CD5* était indispensable à l'entrée du VHC dans les lymphocytes T humains [270]. Notre étude suggère donc que le virus de l'hépatite C pourrait s'accrocher à un lymphocyte T régulateur.

Par la suite, nous avons réalisé des expériences d'inoculation des Treg en présence ou en l'absence des particules du VHC, et les résultats de l'analyse transcriptomiques ont révélé une augmentation significative de l'expression de l'ensemble des récepteurs et corécepteurs d'entrée du VHC notamment celle du *CD81*, *TLR-7*, *TLR-9* et *CD5*. Or, les récepteurs *TLR-7* et *TLR-9* sont des molécules intracellulaires responsables de la reconnaissance des acides nucléiques viraux internalisés. Leur augmentation, associée à celle du *CD81* et du *CD5* laisse penser que le VHC peut non seulement s'accrocher mais également internaliser les Treg $CD4+CD25^{+high}CD127^{-low}$. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation significative de l'expression de *CLDN1* après incubation des Treg avec le VHC. En effet, des études ont montré que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la Claudine 1 inhibait l'internalisation de tous les génotypes du VHC dans les hépatocytes en culture primaire [298], suggérant ainsi le rôle clé des protéines de jonctions serrées dans l'internalisation du VHC [303]. Nos résultats suggèrent donc que les Treg $CD4+CD25^{+high}CD127^{-low}$ pourraient accrocher le virus de l'hépatite C, qui pourrait par ailleurs s'y internaliser.

Afin d'évaluer l'internalisation réelle du VHC dans les Treg, nous avons analysé la présence des protéines virales dans les Treg. Pour ce faire, nous avons effectué des cultures de Treg ou de Huh7 (témoin d'infection) en présence ou non des particules virales du VHC. 72H post-inoculation (72H p.i), les cellules ont été fixées et les protéines virales marquées. De façon totalement inédite, nos expériences d'immunofluorescence et nos analyses par western blot ont montré que, tout comme les lignées d'hépatome humain Huh7 mais à des niveaux plus faibles, les protéines virales E1, E2, Core et NS5A pouvaient être détectées dans les Treg naturels. Or, la plupart de ces protéines virales ne sont exprimées qu'à la suite d'une internalisation réelle du génome viral dans la cellule. Ainsi, leur détection dans les Treg suggère fortement l'internalisation du VHC dans les lymphocytes T régulateurs humains. Ces résultats sont en corrélation avec les données des littératures qui ont suggéré que le VHC pouvait infecter des PBMC et les lymphocytes T humains [270, 896]. Cependant, nos observations restent extrêmement originales car elles montrent, pour la première fois, la détection du virus de l'hépatite C dans des lymphocytes T régulateurs.

Notre interrogation suivante a été de savoir si l'internalisation ou le simple contact du virus de l'hépatite C était susceptible de modifier le phénotype régulateur des cellules CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}. Ainsi, nous avons analysé l'expression des marqueurs phénotypiques associés aux Treg après inoculation avec le VHC. De manière très intéressante, les analyses montrent une augmentation significative de l'expression des marqueurs *CD4*, *CD25*, *FOXP3*, *CTLA4*, *LAG3* et une sous expression relative du *CD127*, suggérant ainsi une augmentation du phénotype régulateur. En effet, de nombreuses études ont montré qu'en plus du CD4, du CD25 et de la sous expression du CD127, les Treg naturels étaient caractérisés par l'expression concomitante d'un ensemble de marqueurs tels que CTLA-4 (cytotoxic T lymphocytes associated protein 4), CD62L (L-selectine), CD44, LAG3 (lymphocytes activating gene3), GITR (Glucocorticoid Induced TNFR-Related gene), CD39, CD73 et ICOS (Inducible costimulator) [682-684, 748, 749-751]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que les molécules CTLA4, ICOS et LAG3 étaient des marqueurs des Treg hautement suppressifs capables d'inhiber les réponses immunes par la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β [753, 897]. Ces données sont donc en accord avec nos travaux qui suggèrent une augmentation du phénotype régulateur de Treg par le VHC. Cette hypothèse est confortée par des données de la littérature qui ont montré que la transfection des lignées jurkat (lymphocytes T) avec le VHC augmentait l'expression du CTLA4 et du FOXP3, rendant ces cellules immunosuppressives et capables d'inhiber les réponses TCD4⁺ et TCD8⁺ [890]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'expression du CD127 corrélait inversement avec la fonction suppressive des Treg [745], suggérant qu'une diminution de l'expression du CD127 (comme observé dans notre étude) conduit à une augmentation du phénotype régulateur. Ces données ont été confirmées par des analyses en cytométrie de flux qui ont montré une augmentation significative de l'expression protéique des marqueurs CD4, CD25 et une diminution du CD127 dans les Treg inoculés avec le VHC. Cette augmentation du phénotype régulateur (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻) ne semble pas nécessiter une réplication du virus, dans la mesure où de nombreux travaux suggèrent que les particules virales du VHC ne peuvent s'internaliser dans les cellules hôte (Huh7) qu'après plusieurs heures. Or, nos résultats montrent que dès 3h post-inoculation, le VHC augmente déjà, et ce de façon significative, le phénotype régulateur des Treg, suggérant ainsi qu'un simple contact du virus avec les Treg pourrait potentialiser le phénotype suppresseur.

Les résultats de cet impact direct du VHC sur le phénotype régulateur des Treg, nous ont incités à évaluer si le VHC pouvait altérer leur état d'anergie et favoriser leur expansion. En effet, les Treg naturels sont généralement décrits comme totalement anergiques *in vitro* en particulier à cause de leur incapacité à exprimer et à produire des facteurs de prolifération tels que l'IL-2 [710]. Cependant, de nombreuses équipes dont la notre, ont décrit une augmentation intra-hépatique et

périphérique des Treg chez les patients VHC+ mais aucune étude ne permet d'affirmer si l'augmentation de cette fréquence représente une réponse VHC-spécifique (prolifération) ou si cette augmentation est une conséquence de l'inflammation chronique de la maladie hépatique (recrutement). Dans cette étude, nous montrons que le virus de l'hépatite C peut directement favoriser l'expansion des Treg naturels. En effet, nous avons analysé l'expansion et la prolifération *in vitro* des Treg inoculés ou non avec le VHC. Les résultats montrent une augmentation significative et progressive de la prolifération des Treg naturels inoculés, suggérant ainsi une expansion des Treg induite par le VHC. Ces résultats clés sont en corrélation avec les données de la littérature qui décrivent une expansion importante des Treg pendant la phase aiguë de l'infection virale [868]. En effet, ces travaux de la littérature ont décrit une augmentation importante de la fréquence périphérique des Treg naturels CD4+CD25+ chez les patients VHC+ (13.5% vs 5.3% chez les donneurs sains) [868]. Nous avons également réalisé des études transcriptomiques et nos résultats ont montré que le VHC augmente significativement l'expression des molécules *IL-4*, *BCL6* et *IL-15* notamment 24h post-inoculation. Or, ces molécules sont connues pour être des facteurs importants dans la prolifération lymphocytaire [898]. Plus intéressant encore, notre étude à 24h post-inoculation, montre que le VHC augmente significativement l'expression de *l'IL-2*, cytokine clé de prolifération des Treg [492]. La sécrétion effective de cette cytokine a d'ailleurs pu être confirmée par des ELISA montrant que le VHC augmente la sécrétion de l'IL-2 par les Treg notamment à 48h p.i., avec un fold de 4 à 6 fois comparée aux cellules contrôles. Or nos travaux ont également montré une augmentation de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (*CD25*) sur les Treg inoculés avec du VHC. L'ensemble de ces données suggère l'hypothèse selon laquelle le virus de l'hépatite C conduirait les Treg à produire de l'IL-2 qui serait ensuite rapidement capté par ses récepteurs spécifiques, selon une boucle autocrine, afin de favoriser leur propre expansion.

D'autres travaux de la littérature ont montré que le VHC pouvait lui-même favoriser la prolifération des Treg par la stimulation de la production de quantités importantes de TGF- β qui stimulent l'émergence de lymphocytes T régulateurs [874]. Ces données sont corrélées avec nos travaux qui montrent également une augmentation significative de l'expression et de la sécrétion du TGF- β 1 par les Treg en présence du VHC. Nos travaux corrélerent aussi avec les données de la littérature qui ont montré que des peptides antigéniques du VHC pouvaient être reconnus par des Treg CD4+CD25+ circulant dans le sang de patients infectés et favoriser leur expansion VHC-spécifique au cours de l'infection chronique [880]. L'ensemble de nos données suggère donc un impact direct du VHC sur les Treg qui favoriserait leur expansion. Néanmoins, le rôle spécifique de l'expansion des Treg dans la persistance virale n'est pas encore bien décrit, même si de nombreuses études ont clairement suggéré une corrélation positive entre la fréquence élevée des Treg et la

progression de la maladie [90, 889]. Ainsi, les résultats de notre étude confirmeraient qu'il existe un impact direct du VHC à la fois sur le phénotype des Treg naturels $CD4^+CD25^{+/high}CD127^{/low}$ ainsi que sur leur expansion, laissant supposer que le VHC pourrait également potentialiser l'activité suppressive des Treg.

Les mécanismes exacts impliqués dans la défaillance du système immunitaire de l'hôte pour lutter contre l'infection par le VHC restent encore mal-compris, mais de nombreuses études dont les nôtres, attribuent cette défaillance, en partie, à l'activité des lymphocytes T régulateurs. Pour étayer cette hypothèse, nous avons évalué l'impact du VHC sur la capacité des Treg à supprimer la prolifération des PBMC autologues. Par des expériences de suppression, nous avons mis en évidence une augmentation de la capacité des Treg à supprimer la prolifération des PBMC lorsque ces Treg étaient préalablement inoculés avec le VHC. Nos résultats montrent donc qu'en plus d'augmenter le phénotype et de favoriser l'expansion des Treg, le VHC potentialise également l'activité suppressive des $CD4^+CD25^{+/high}CD127^{/low}$ les rendant plus suppresseurs. Ces résultats sont en corrélation avec les données de la littérature qui ont montré que les Treg isolés de patients infectés par le VHC possédaient une activité suppressive plus importante que les Treg isolés de patients guéris [866, 867].

De nombreuses études ont montré que les lymphocytes T régulateurs pouvaient supprimer la réponse immune par des mécanismes contacts-cellulaires dépendants et/ou par la sécrétion de cytokines immunosuppressives [646, 685]. Afin de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu dans l'aggravation de cette activité suppressive, nous avons analysé l'impact du VHC sur les différents mécanismes de suppression des Treg. Nos résultats ont tout d'abord montré une augmentation significative de l'expression des marqueurs associés à l'activité suppressive des Treg par contact-cellulaire, tels que le *CTLA4* et *LAG3*, qui sont connus pour inhiber la fonction des cellules dendritiques [685, 811]. Nos travaux montrent également une augmentation des marqueurs *CD39* et *CD73* qui sont des ecto-nucléotidases impliquées dans la destruction du métabolisme des cellules effectrices [799, 800]. Comme décrit plus haut, cette étude montre aussi que le VHC augmente significativement le *CD25*, induisant la déprivation du milieu en cytokine de prolifération ce qui conduit à la mort cellulaire des cellules effectrices [793-795]. Notre étude montre également que le VHC augmente significativement l'expression de granzyme B (*GZMB*) par les Treg. Or, granzyme B est une molécule cytotoxique impliquée dans la mort des cellules effectrices par apoptose [821]. Par ailleurs, nos résultats montrent que le VHC augmente significativement l'expression et la sécrétion de la cytokine immunosuppressive TGF- β 1 avec un pic à 48H post-inoculation. Ces résultats confortent certaines études qui ont décrit une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β par les Treg après stimulation antigénique spécifique par la protéine

de la capsid du VHC (Core) [878, 882]. Enfin, nos travaux montrent que le VHC favorise une augmentation de l'expression du facteur de transcription TBX21(*TBET*), connu pour favoriser l'activité suppressive anti-inflammatoire Th1 [754]. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que le virus de l'hépatite C interagit directement avec les lymphocytes T régulateurs pour potentialiser leur activité immunosuppressive, aggravant ainsi le microenvironnement hépatique et favorisant la progression de la maladie.

Or, cette aggravation de l'hépatite C est la principale cause des dommages au foie chez les patients chroniquement infectés par le VHC [39, 55]. En effet, chez environ 80% des patients, le passage de l'infection aiguë à la chronicité survient malgré l'expression d'une réponse immune anti-virale. Les acteurs majeurs de cette réponse anti-virale sont les lymphocytes TCD4+ qui peuvent se différencier en Th1 (sécréteurs d'IL-2, IL-12, TNF α et IFN- γ) [602], Th2 (sécréteurs d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13) [604] et Th17 (sécréteurs d'IL-17, IL-21, IL-23 et IL-26 [474]. De nombreuses études ont décrit une augmentation des cellules Th2 au dépend des cellules Th1 chez les patients ayant une évolution chronique de l'hépatite C [602]. De plus, d'autres études ont décrit une augmentation significative intra-hépatique et périphérique de lymphocytes Th17 chez patients chroniques VHC+ [899-901], suggérant que l'augmentation de la fréquence des cellules sécrétrices d'IL-17 pouvait aggraver l'inflammation hépatique et accélérer le développement de lésions hépatiques (fibrose sévère) [900, 901]. Or, des études ont montré que les Treg étaient dotés de propriétés de plasticité et pouvaient sécréter des cytokines appartenant aux profils Th1, Th2 ou Th17 [500, 784]. En effet, des études ont identifié des cellules Treg FOXP3+ sécrétrices d'IL-17 dans le sang humain [902]. Ces données confortent notre étude qui montre une augmentation de l'expression de l'*IL-17*, de l'*IL-21* et de l'*IL-23* par les Treg incubés avec du VHC. En outre, des analyses ELISA ont confirmés que le VHC augmente significativement la sécrétion de l'IL-17 par les Treg, avec un pic à 48H p.i. Ces données pourraient ainsi suggérer la présence des lymphocytes Treg IL-17+ dans le développement des lésions hépatiques chez les patients chroniquement infectés par le VHC. En effet, des études ont montré que le déséquilibre Treg/Th17 jouait un rôle très important dans la persistance du VHC [903]. Par ailleurs, des travaux ont clairement montré que les Treg sécréteurs d'IL-17 conservaient parfaitement leur activité suppressive [904]. Ainsi, nos résultats pourraient suggérer que l'interaction VHC/Treg, en plus d'aggraver significativement l'environnement immunosuppresseur, pourrait également potentialiser le développement des lésions hépatiques, favorisant ainsi la progression de la maladie.

Des travaux antérieurs de l'équipe ont décrit une augmentation de la fréquence intra-hépatique des Treg [905], suggérant ainsi un recrutement important des Treg vers le foie. D'autres travaux de la littérature ont montré, au cours de l'hépatite C, une augmentation de l'expression des

chimiokines CCL-17 et CCL-22 dans l'environnement hépatique, capables d'attirer les Treg vers le foie afin d'altérer la réponse immunitaire anti-virale [89]. Cependant, les mécanismes induisant ce recrutement intra-hépatique des Treg naturels restaient encore mal connus. De façon intéressante, par des expériences directes de migration en chambre de boyden, nos travaux ont montré que les surnageants des hépatocytes primaires humains, infectés *in vitro* par le VHC, attiraient des quantités importantes de Treg comparés aux surnageants d'hépatocytes non-infectés. Plus intéressant encore, le potentiel chimio-attractant des surnageants d'hépatocytes infectés est comparable à celui de la chimiokine recombinante SDF1 α (CXCL-12), connue pour attirer les Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ dans le foie [906]. De plus, nos travaux montrent que lorsque les Treg sont préalablement inoculés avec le VHC, ils sont sensiblement plus attirés par les surnageants d'hépatocytes, suggérant ainsi un rôle clé du virus sur le recrutement des Treg naturels. Ces travaux pourraient expliquer, en partie, des travaux antérieurs de l'équipe qui ont décrit un recrutement important des Treg au cours de la progression de la maladie ainsi qu'au cours de la récurrence virale après transplantation hépatique [90, 611, 907]. Par ailleurs, ils sont concordants avec l'augmentation de la fréquence intra-hépatique des Treg, retrouvée chez des patients chroniquement infectés par le VHC (article 1). Des analyses approfondies par RT-Q-PCR ont montré que le VHC augmentait significativement l'expression d'un ensemble de chimiokines associées au recrutement des Treg. En effet, nos résultats ont permis de retrouver une augmentation de CCL-17 qui avait déjà été décrite [89], et une augmentation des autres chimiokines telles que CCL-2, CCL-7, CCL-20 et en culture avec des particules VHCcc/JFH1 (inoculés) ou en culture dans du milieu DMEM récoltés après plusieurs passages de Huh7 non-infectés (non-inoculés). Notre étude montre également une augmentation de l'expression des récepteurs spécifiques aux chimiokines tels que CCR-2 (CCL-2), CCR-3 (CCL-7), CCR-4 (CCL-17), CCR-6 (CCL-20), et CXCR-6 (CXCL-16). Ces résultats ont été confirmés par des expériences de neutralisation qui ont montré que l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre les chimiokines CCL-20 et CCL-17 dans les surnageants des hépatocytes infectés, provoquait une diminution significative du recrutement des Treg, suggérant ainsi un rôle clé de ces chimiokines dans le recrutement des Treg. Ces résultats concordent avec des données de la littérature qui ont suggéré que l'augmentation d'un ensemble de chimiokines chez les patients chroniques VHC⁺ était corrélée à l'immuno-pathogénèse de l'infection virale C [908, 909]. Néanmoins, notre étude est la toute première à montrer l'implication de la chimiokine CCL-20 dans le « homing hépatique » des Treg après infection par le virus de l'hépatite C. Nous confirmons ainsi des travaux antérieurs de l'équipe qui ont montré que le recrutement intra-hépatique de cellules T régulatrices était spécifique de l'infection par le VHC, cette augmentation de Treg n'ayant pas été retrouvée dans les biopsies hépatiques de patients présentant un CHC alcoolique [90]. **L'ensemble de ces données suggère donc que le VHC favorise directement le recrutement des Treg vers le**

site de l'infection dans lequel ces cellules aggravent considérablement l'environnement immunosuppresseur, pouvant favoriser la progression de la pathologie.

Cependant, l'augmentation de la fréquence intra-hépatique des lymphocytes T régulateurs observée chez les patients chroniques VHC+ peut également être la conséquence d'une conversion des lymphocytes T conventionnels (Tconv) ou naïfs en lymphocytes T régulateurs induits (iTreg). En effet, différentes études ont montré que certains épitopes immuno-dominants du VHC pouvaient induire l'émergence de iTreg CD4+FOXP3+ capables de supprimer les lymphocytes T effecteurs [877]. Ainsi, l'augmentation de la fréquence des cellules régulatrices chez les patients chroniquement infectés résulterait à la fois d'une expansion des Treg naturels et de l'émergence de iTreg. En ce sens, d'autres études ont montré que les cellules dendritiques (DC) isolées du foie de patients étaient principalement constituées de cellules dendritiques immatures pouvant favoriser la génération des iTreg [886]. Par ailleurs, des études ont confirmés que des co-cultures des DC hépatiques de patients VHC+ en présence des lymphocytes T allogéniques conduisait à la génération des iTreg [527]. Cependant, aucune étude n'a évalué l'impact direct du virus de l'hépatite C sur l'émergence des lymphocytes T régulateurs induits à partir des lymphocytes T conventionnels.

Afin de répondre à cette interrogation, j'ai consacré la dernière partie de ma thèse à étudier l'impact du VHC sur le phénotype et la fonction des lymphocytes T conventionnels (Article 3). Pour ce faire j'ai réalisé des expériences *in vitro* d'inoculation des lymphocytes T conventionnels (Tconv) CD4+CD25-, isolés de poches de sang de donneurs sains, en présence de particules virales infectieuses du VHC.

Dans un premier temps, nous avons isolé et caractérisé les Tconv. Nos résultats montrent que les Tconv isolés possèdent le phénotype CD4+CD25-CD127+. Ces résultats sont conformes avec les données de la littérature qui montrent que les T conventionnels non activés sont caractérisés par l'absence d'expression du marqueur CD25 et par une sur-expression du marqueur CD127 [722, 740, 741]. Nos résultats ont également montré que plus de 97% des Tconv isolés possédaient le phénotype CD4+CD18+CD49b-LAG3-. Ces résultats sont également en accord avec la littérature qui montre que la molécule CD18 est très ubiquitaire et exprimée à la surface des cellules d'origine hématopoïétique telles que les lymphocytes TCD4+ [910]. De plus, nos expériences ont montré que l'activation de ces Tconv induisait leur prolifération *in vitro*, confortant le fait que nous avons isolé des Tconv parfaitement fonctionnels. Ce résultat est corrélé aux données de la littérature qui ont

montré que contrairement aux lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes T conventionnels activés étaient capables de proliférer *in vitro* [710, 911].

Après avoir isolé et caractérisé les Tconv, nous avons voulu évaluer l'impact du VHC sur leur phénotype. En effet, certaines études ont montré que les hépatocytes infectées par le VHC sécrétaient des quantités importantes de TGF- β qui induisaient l'émergence de lymphocytes T régulateurs induits à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs [874]. Nos analyses transcriptomiques montrent que le VHC augmente significativement l'expression des molécules CD18 (*ITGB2*), CD49b (*ITGA2*), *CTLA4* et *LAG3* par les Tconv, suggérant ainsi une modification de leur phénotype en faveur de cellules T régulatrices induites. Ces résultats confortent de précédents travaux de l'équipe qui ont décrit l'augmentation de la fréquence des lymphocytes T régulateurs induits de type 1 (Tr1) CD18⁺CD49b⁺ chez des patients chroniquement infectés par le VHC et chez les patients transplantés pour cause virale C [90, 690, 864]. Par ailleurs, ils sont totalement en adéquation avec de récentes études qui ont montré que les Tr1 possédaient le phénotype CD49b⁺LAG3⁺ [692]. Nos résultats révèlent également une légère augmentation de l'expression du *CD25* et du *FOXP3*, qui sont des marqueurs associés généralement aux T régulateurs naturels [728]. Néanmoins, de nombreuses études ont montré que l'expression induite de FOXP3 chez les Tconv via une translation retro-virale, aboutissait à la conversion de ces Tconv en T régulateurs [731]. Enfin, nos résultats ont révélé une augmentation de l'expression relative des molécules BLIMP1 (*PRDM1*), GITR (*TNFRSF18*), OX40 (*TNFRSF4*), CD39 (*ENTPD1*) et CD73 (*NT5E*) par les Tconv inoculés avec le VHC. Or l'expression de ces marqueurs a également été associée au phénotype d'autres populations de lymphocytes T régulateurs induits [856, 912]. Ainsi, nos données suggèrent l'hypothèse selon laquelle VHC induirait l'émergence de cellules régulatrices autres que les Tr1. En effet, des données de la littérature ont montré que les lymphocytes T régulateurs induits de type Th3 pouvaient exprimer le phénotype CD25⁺CTLA4⁺FOXP3^{+/-} [669-671]. De plus, d'autres études ont montré que certains épitopes immuno-dominants du VHC étaient capables de générer des iTreg CD4⁺FOXP3⁺ à partir de cellules TCD4⁺ [877]. Ainsi, nos résultats suggèrent l'émergence de lymphocytes T régulateurs induits à partir de Tconv cultivés avec du VHC.

Afin de conforter ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons évalué la fréquence des populations de iTreg au sein des lymphocytes T conventionnels après incubation avec le VHC. Nos analyses en cytométrie de flux ne montrent pas de différences significatives (légère baisse) de la fréquence des cellules CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ entre les Tconv inoculés avec du VHC versus Tconv non-inoculés. Mais de façon très intéressante, notre étude montre une nette augmentation de la fréquence des cellules CD49b⁺LAG3⁺ au sein des Tconv inoculés avec le VHC comparés aux contrôles, confortant ainsi l'hypothèse de l'émergence de lymphocytes de type Tr1. En effet, des

données de la littérature et des travaux antérieurs de l'équipe qui ont montré que les Tr1 exprimaient le phénotype CD49b+LAG3+ [690, 692]. Par ailleurs, différentes études ont montré l'augmentation de la fréquence des cellules Tr1 et Th3 dans le sang de patients chroniquement infectés par le VHC [871, 881]. L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que l'interaction du VHC avec les lymphocytes T conventionnels pourrait favoriser l'émergence de populations T régulatrices induites.

Afin de valider la fonction suppressive de ces cellules « converties », nous avons préalablement cultivé des Tconv pendant 48h en présence ou pas des particules virales du VHC. Puis, ces cellules ont été mises en co-cultures avec des PBMC autologues pendant 48H supplémentaires. L'évaluation de la capacité suppressive des Tconv sur la prolifération des PBMC autologues a été mise en évidence par incorporation de la thymidine tritiée dans des tests de MLR. Dans un premier temps, nos résultats ont montré que le VHC augmentait significativement la prolifération des Tconv. Cette donnée est conforme à la littérature car il est connu que l'infection virale favorise la prolifération et l'expansion des cellules immunitaires [913]. Nos résultats ont également montré que les Tconv inoculés avec du VHC, étaient capables d'inhiber la prolifération des PBMC autologues et ce dès le faible ratio de 4 :1 (4 PBMC pour 1 Tconv). Ces résultats sont très intéressants car ils suggèrent que le VHC pourrait favoriser l'émergence de cellules régulatrices induites capables de supprimer la réponse immune. Cette hypothèse est corrélée à des données de la littérature qui ont montré que la transfection du VHC dans lignées de cellules T (jurkat) favorisait l'émergence de cellules CD4+CTLA4+FOXP3+ capables d'inhiber les réponses TCD4+ et TCD8+ [890]. De plus, des études récentes ont montré que les lymphocytes TCD4+ primaires, exprimant la protéine Core du VHC, étaient capables de sur-exprimer FOXP3 et de supprimer les cellules T [914]. Ainsi, nos résultats suggèrent que le VHC pourrait directement favoriser l'émergence d'iTreg capables d'inhiber la réponse immune.

Afin de déterminer les mécanismes impliqués dans cette immunosuppression, nous avons réalisé des analyses transcriptomiques et nos résultats révèlent que le VHC augmente significativement l'expression de granzyme A (*GZMA*), granzyme B (*GZMB*), *IL-10*, *TGF-β1*, *TGF-β3* et *IL-35 (EBI3)* qui sont des molécules associées à une activité immuno-régulatrice. En effet, de nombreux travaux ont montré que ces molécules participaient à la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs [646, 915]. De plus, des études ont montré que certaines molécules comme les granzymes A/B étaient fortement produites par les iTreg [646, 915]. D'autres études ont également montré que la cytokine IL-10 était principalement sécrétée par les Tr1 [663] tandis que le TGF-β était principalement sécrété par les Th3 [667, 668]. Par la suite, nos résultats ont été confortés par des analyses par ELISA qui montrent que le contact du VHC augmente la sécrétion de

l'IL-10 par les lymphocytes T conventionnels, et ce dès 24H post-inoculation (p.i), confortant ainsi l'hypothèse selon laquelle le VHC favoriserait l'émergence des Tr1. Ces résultats viennent renforcer les précédents travaux de l'équipe qui ont décrit une augmentation de la fréquence périphérique des cellules CD4+IL-10+ chez des patients chroniques VHC+ [610, 611]. De plus, nos résultats montrent une augmentation de la sécrétion de l'IL-4 par les Tconv mis en présence du VHC, suggérant ainsi l'émergence de populations Th3. En effet, des études ont montré que la sécrétion de l'IL-4 était indispensable à l'activité des Th3 car elle contrôlerait la production du TGF- β 1 [667, 668]. Par ailleurs, des travaux ont montré que l'IL-4 pouvait favoriser l'émergence de lymphocytes T régulateurs induits CD4+CD25+FOXP3+CTLA4+ à partir des Tconv et que ces iTreg étaient capables de supprimer la réponse immune des T effecteurs [916].

Nos résultats montrent également une diminution de la sécrétion de l'IL-2 dès 24H p.i par les Tconv mis en présence du VHC, pouvant suggérer l'installation d'une anergie. Cette hypothèse est appuyée par des données de la littérature qui montrent que les iTreg (en particulier les Tr1) seraient anergiques *in vitro*, même après stimulation de leur TCR et que ceci serait une conséquence de l'effet autocrine de l'IL-10 [699]. Ainsi, ce résultat conforte notre hypothèse selon laquelle le VHC induirait l'émergence de cellules régulatrices (Tr1 ou Th3) qui sont anergiques *in vitro* et capables d'inhiber la réponse immune.

Nos résultats montrent également une forte sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-17 par les Tconv activés mais plus particulièrement par les Tconv inoculés avec du VHC. Ces données sont en corrélation avec les travaux de la littérature qui ont décrit l'augmentation de la fréquence des cellules T sécrétrices d'IL-17 dans le foie de patients chroniques VHC+ [900]. Ainsi, nos travaux semblent suggérer l'existence d'un double impact du VHC sur les lymphocytes TCD4+. Cet effet double pourrait induire la production concomitante de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui « shape » la réponse immune. En effet, des études ont montré que de fortes concentrations d'IL-6 associées à la production du TGF- β pouvaient favoriser le développement des populations Th17, principales sécrétrices d'IL-17 [918]. ***Ainsi, la mesure d'une forte concentration des cytokines pro-inflammatoires (IL-17 et IFN- γ) et la détection d'une concentration relativement élevée d'IL-10 associée à une augmentation de la fréquence des cellules CD4+CD49b+LAG3+ parmi les Tconv inoculés avec le VHC, suggèrent que, seule une partie des lymphocytes T conventionnels serait convertie en lymphocytes T régulateurs induits : Tr1, Th3 et/ou autres iTreg. Cette balance de cytokines pro- et anti-inflammatoires pourraient contribuer à la modulation du phénotype et de l'activité anti-virale des lymphocytes TCD4+ au cours de l'hépatite C.***

En conclusion, l'ensemble de mes travaux de thèse suggère que le VHC favorise l'installation d'un micro-environnement immunosuppresseur, en potentialisant le recrutement intra-hépatique des Treg naturels et en augmentant leur phénotype et leur activité suppressive. De plus, le VHC semble favoriser l'émergence de lymphocytes T régulateurs induits à partir de lymphocytes T conventionnels. Ainsi, l'aggravation de l'environnement immunosuppresseur pourrait expliquer, en partie, l'échappement du virus au système immunitaire et favoriser la progression de l'hépatite C vers la cirrhose et potentiellement le carcinome hépatocellulaire.

MOT DE LA FIN : POUVONS-NOUS DIRE ADIEU A L'HEPATITE C ?

Les progrès spectaculaires développés ces deux dernières années, dans les traitements de l'hépatite C créent une situation dans laquelle, en théorie, toutes les personnes infectées par le virus de l'hépatite C pourront être soignées avec les nouvelles molécules anti-virales (DAA), à condition, bien évidemment, que ces personnes puissent avoir accès à ces nouvelles thérapies [919]. Ainsi, l'enjeu majeur dans l'hépatite C s'est progressivement déplacé de « la recherche de meilleurs traitements » vers « permettre l'accessibilité aux nouvelles thérapies pour tous ». En effet, les nouvelles thérapies anti-virales représentent aujourd'hui, un espoir d'élimination de l'hépatite C, principalement dans les pays développés [919]. Ainsi, rendre ces traitements accessibles aux zones d'endémie les plus importantes et qui sont majoritairement sous-développées, pourrait permettre l'éradication totale de la maladie dans le monde. Par ailleurs, au-delà des questions encore en suspens sur les médicaments eux-mêmes, l'éradication de l'hépatite C nécessitera également, des changements majeurs dans l'accès aux soins, dans la prestation des soins et dans la politique des prix des médicaments. En effet, sans une forte mobilisation et sans une politique humanitaire généralisée, nous pensons que l'éradication totale de l'hépatite C est loin d'être atteinte. De plus, il n'existe pas de réservoir animal pour le VHC (excepté le chimpanzé) [29], ce qui rend plus tangible l'hypothèse d'une éradication complète de l'hépatite C en théorie. Néanmoins, l'absence de vaccin préventif contre le VHC, nous permet de penser qu'une éradication complète de l'hépatite C semble utopique en pratique.

Comme je l'ai spécifié dans le *chapitre II*, l'objectif ultime dans la lutte contre l'hépatite C, serait le développement d'une molécule anti-virale parfaite « *Perfectovir* », qui posséderait des caractéristiques succinctes : administration orale, dosage simple, taux d'efficacité élevé (>100%) même lors des cirrhoses décompensés, meilleure tolérance, toxicité minimale, résistance virale minimale, meilleure activité pan-génotypique, durée de traitement limitée, interactions limitées avec d'autres traitements mais surtout avoir un prix très abordable [391].

Actuellement, les résultats de l'utilisation des nouvelles molécules anti-virales (Simeprévir, Sofosbuvir, Daclatasvir, Lédipasvir, etc.) en Europe et aux USA révèlent que nous assistons à une révolution importante dans l'histoire de l'hépatite C [395]. En effet, de nombreuses études montrent que leur utilisation en mono-, bi- ou en tri-thérapie permet d'obtenir une réponse virologique soutenue (SVR) voire exceptionnelle chez pratiquement tous les patients infectés [382], ainsi que chez les patients transplantés chez qui ces molécules limiteraient la récurrence [398, 920]. D'ailleurs,

de nombreux experts s'accordent à dire que nous vivons, là, « *le début de la fin de l'hépatite C* » [919]. Néanmoins, quelques études montrent que ces traitements seraient inefficaces chez environ 10% des patients, sans que les raisons de cette résistance ne soient clairement définies [30, 396, 397]. Néanmoins, il est légitime de penser que, tout comme la progression de l'hépatite C[411], la résistance aux traitements anti-viraux pourrait être associée à un système immunitaire défaillant. Même si les mécanismes exacts impliqués dans la défaillance du système immunitaire de l'hôte pour lutter contre l'infection par le VHC restent encore mal-compris, de nombreuses études dont les nôtres, attribuent cette défaillance, en partie, à l'activité importante des lymphocytes T régulateurs. Ce qui suggère donc que nous pourrions améliorer la réponse immunitaire en manipulant par exemple la fréquence ou l'activité des lymphocytes T régulateurs humains (Treg).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Krugman, S., *Symposium on immunization. Prospects for vaccination against rubella*. Arch Environ Health, 1967. **15**(4): p. 495-501.
2. Abbas, A.K., et al., *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. Nat Immunol, 2013**14**(4): p. 307-8.
3. Dienstag, J.L., *Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features*. Gastroenterology, 1983. **85**(2): p. 439-62.
4. Alter, H.J., et al., *Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis*. N Engl J Med, 1989. **321**(22): p. 1494-500.
5. Alter, H.J., et al., *Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis*. Lancet, 1975. **2**(7940): p. 838-41.
6. Hoofnagle, J.H., et al., *Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report*. N Engl J Med, 1986. **315**(25): p. 1575-8.
7. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
8. Maheshwari, A., S. Ray, and P.J. Thuluvath, *Acute hepatitis C*. Lancet, 2008. **372**(9635): p. 321-32.
9. Kohli, A., et al., *Treatment of hepatitis C: a systematic review*. Jama, 2015. **312**(6): p. 631-40.
10. Hadigan, C. and S. Kottlilil, *Hepatitis C virus infection and coinfection with human immunodeficiency virus: challenges and advancements in management*. Jama 2015, 2011. **306**(3): p. 294-301.
11. Lavanchy, D., *Evolving epidemiology of hepatitis C virus*. Clin Microbiol Infect. **17**(2): p. 107-15.
12. Frank, C., et al., *The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt*. Lancet, 2000. **355**(9207): p. 887-91.
13. Breban, R., et al., *Towards realistic estimates of HCV incidence in Egypt*. J Viral Hepat, 2013. **20**(4): p. 294-6.
14. Dore, G.J., J. Ward, and M. Thursz, *Hepatitis C disease burden and strategies to manage the burden (Guest Editors Mark Thursz, Gregory Dore and John Ward)*. J Viral Hepat, 2014. **21 Suppl 1**: p. 1-4.
15. Meffre, C., et al., *Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: social factors are important predictors after adjusting for known risk factors*. J Med Virol, 2010. **82**(4): p. 546-55.
16. Deuffic, S., et al., *Modeling the hepatitis C virus epidemic in France*. Hepatology, 1999. **29**(5): p. 1596-601.
17. Enquête réalisée en partenariat entre l'Institut de Veille Sanitaire, I.C.N.d.I.A.M.e.d.T.S., le Centre Technique d'Appui et de Formation des Centres d'Examens de Santé et les Centres d'Examens de Santé *Estimation des taux de prévalence des anticorps anti-VHC et des marqueurs du virus de l'hépatite B chez les assurés sociaux du régime général de France métropolitaine, 2003-2004*. Am J Med Genet A, 2005. **164A**(7): p. 1627-34.
18. Wedemeyer, H., et al., *Strategies to manage hepatitis C virus (HCV) disease burden*. J Viral Hepat, 2014. **21 Suppl 1**: p. 60-89.
19. Razavi, H., et al., *The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm*. J Viral Hepat, 2014. **21 Suppl 1**: p. 34-59.
20. Lavanchy, D., *Evolving epidemiology of hepatitis C virus*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(2): p. 107-15.
21. Rantala, M. and M.J. van de Laar, *Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review*. Euro Surveill, 2008. **13**(21).
22. Cornberg, M., et al., *A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel*. Liver Int, 2011. **31 Suppl 2**: p. 30-60.
23. Ebeling, F., *Epidemiology of the hepatitis C virus*. Vox Sang, 1998. **74 Suppl 2**: p. 143-6.
24. Vandelli, C., et al., *Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(5): p. 855-9.
25. Thomas, S.L., et al., *A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection*. Int J Epidemiol, 1998. **27**(1): p. 108-17.
26. Gibb, D.M., et al., *Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission*. Lancet, 2000. **356**(9233): p. 904-7.
27. Alipour, A., et al., *Sexual Transmission of Hepatitis C Virus Between HIV Infected Subjects and Their Main Heterosexual Partners*. Hepat Mon, 2013. **13**(11): p. e13593.
28. Ponde, R.A., *Hidden hazards of HCV transmission*. Med Microbiol Immunol. **200**(1): p. 7-11.
29. Simmonds, P., *The origin of hepatitis C virus*. Curr Top Microbiol Immunol, 2013. **369**: p. 1-15.
30. Dhumeaux, *Prise en charge des personnes infectées par les virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C. Rapport de recommandations 2014*. ANRS/AFEF/Ministère des affaires sociales et de la santé, 2014.

31. Saito, I., et al., *Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6547-9.
32. Ulrich, P.P., et al., *Detection, semiquantitation, and genetic variation in hepatitis C virus sequences amplified from the plasma of blood donors with elevated alanine aminotransferase*. J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1609-14.
33. Loizides-Mangold, U., et al., *HCV 3a core protein increases lipid droplet cholesteryl ester content via a mechanism dependent on sphingolipid biosynthesis*. PLoS One. **9**(12): p. e115309.
34. Gelderblom, H.C., et al., *Inflammatory markers neopterin and alanine aminotransferase in HCV patients treated with HCV NS3.4A protease inhibitor telaprevir (VX-950) and/or peginterferon alfa-2a*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(9): p. 1122-7.
35. Santantonio, T., et al., *Risk factors and outcome among a large patient cohort with community-acquired acute hepatitis C in Italy*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(9): p. 1154-9.
37. Castello, G., et al., *HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer*. Clin Immunol, 2013. **134**(3): p. 237-50.
38. Lauer, G.M. and B.D. Walker, *Hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2001. **345**(1): p. 41-52.
39. Mushahwar, I.K., et al., *Interpretation of various serological profiles of hepatitis B virus infection*. Am J Clin Pathol, 1981. **76**(6): p. 773-7.
40. Villano, S.A., et al., *Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection*. Hepatology, 1999. **29**(3): p. 908-14.
41. Santantonio, T., et al., *Neutralizing antibodies to interferon alpha in a chronic hepatitis C patient non-responder to pegylated interferon*. J Hepatol, 2006. **45**(5): p. 759-61.
42. Post, J.J., et al., *Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort*. J Infect Dis, 2004. **189**(10): p. 1846-55.
43. Farci, P., et al., *Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure*. N Engl J Med, 1996. **335**(9): p. 631-4.
44. Bernuau, J., B. Rueff, and J.P. Benhamou, *Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes*. Semin Liver Dis, 1986. **6**(2): p. 97-106.
45. Lee, W.M., *Acute liver failure*. Am J Med, 1994. **96**(1A): p. 3S-9S.
46. Chu, C.M., C.T. Yeh, and Y.F. Liaw, *Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus*. Gut, 1999. **45**(4): p. 613-7.
47. Wright, T.L., *Etiology of fulminant hepatic failure: is another virus involved?* Gastroenterology, 1993. **104**(2): p. 640-3.
48. Feray, C., et al., *Hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in serum and liver of patients with fulminant hepatitis*. Gastroenterology, 1993. **104**(2): p. 549-55.
49. Kato, T., et al., *Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient*. J Med Virol, 2001. **64**(3): p. 334-9.
50. Kato, T. and T. Wakita, *[Production of infectious hepatitis C virus in cell culture]*. Uirusu, 2005. **55**(2): p. 287-95.
51. Wakita, T., et al., *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 791-6.
52. Inglesby, T.V., et al., *A prospective, community-based evaluation of liver enzymes in individuals with hepatitis C after drug use*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 590-6.
53. Persico, M., et al., *Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels*. Gastroenterology, 2000. **118**(4): p. 760-4.
54. Conry-Cantilena, C., et al., *Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 1996. **334**(26): p. 1691-6.
55. Takahashi, M., et al., *Natural course of chronic hepatitis C*. Am J Gastroenterol, 1993. **88**(2): p. 240-3.
56. Roudot-Thoraval, F., et al., *Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6,664 patients. The Study Group for the Prevalence and the Epidemiology of Hepatitis C Virus*. Hepatology, 1997. **26**(2): p. 485-90.
57. Alter, H.J. and L.B. Seeff, *Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome*. Semin Liver Dis, 2000. **20**(1): p. 17-35.
58. Cramp, M.E., *Hbv + Hcv = Hcc?* Gut, 1999. **45**(2): p. 168-9.
59. Bochud, P.Y., et al., *Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2009. **51**(4): p. 655-66.
60. Zignego, A.L., et al., *Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach*. Dig Liver Dis, 2007. **39**(1): p. 2-17.
61. Li, Y., et al., *Multiple variants in toll-like receptor 4 gene modulate risk of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection*. J Hepatol, 2009. **51**(4): p. 750-7.

62. Trepo, E., et al., *Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2011. **54**(1): p. 60-9.
63. Al Marzooqi, S.H. and J.J. Feld, *Sorting out cirrhosis: Mechanisms of non-response to hepatitis C therapy*. *Liver Int*, 2015.
64. Mannan, R., et al., *A comparative evaluation of scoring systems for assessing necro-inflammatory activity and fibrosis in liver biopsies of patients with chronic viral hepatitis*. *J Clin Diagn Res*, 2014. **8**(8): p. FC08-12.
65. Fattovich, G., et al., *Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(2): p. 463-72.
66. Hassan, E.A. and A.S. Abd El-Rehim, *Creatinine modified Child-Turcotte-Pugh and integrated model of end stage liver disease scores as predictors of spontaneous bacterial peritonitis related in-hospital mortality: applicable or not*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015.
67. Farnsworth, N., et al., *Child-Turcotte-Pugh versus MELD score as a predictor of outcome after elective and emergent surgery in cirrhotic patients*. *Am J Surg*, 2004. **188**(5): p. 580-3.
68. Degos, F., et al., *Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death*. *Gut*, 2000. **47**(1): p. 131-6.
69. Hassan, M.M., et al., *Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States*. *J Clin Gastroenterol*, 2002. **35**(3): p. 266-9.
70. Cowie, e.a., *L'épidémie mondiale des maladies hépatiques attribuables au VHB, au VHC et à l'alcool : mortalité en augmentation*. <http://www.edimark.fr/ejournaux/AASLD/2013/breve/2417/l-epidemie-mondiale-des-maladies-hepatiques-attribuables-au-vhb-au-vhc-et-a-l-alcool-mortalite-en-augmentation>, 2013. **164A**(abstract 23, actualisé): p. 1627-34.
71. Yang, J.D. and L.R. Roberts, *Hepatocellular carcinoma: A global view*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010. **7**(8): p. 448-58.
72. GLOBOCAN, *estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>, 2012. **164A**(7): p. 1627-34.
73. organisation, W.h., *hepatitis C*. <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index3.html>, 2003. **164A**(7): p. 1627-34.
74. Kanwal, F., et al., *Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection*. *Gastroenterology*, 2010. **140**(4): p. 1182-1188 e1.
75. Altekruse, S.F., K.A. McGlynn, and M.E. Reichman, *Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(9): p. 1485-91.
76. Nguyen, V.T., M.G. Law, and G.J. Dore, *Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden*. *J Viral Hepat*, 2009. **16**(7): p. 453-63.
77. Choi, J. and J.H. Ou, *Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(5): p. G847-51.
78. Nordenstedt, H., D.L. White, and H.B. El-Serag, *The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma*. *Dig Liver Dis*, 2010. **42 Suppl 3**: p. S206-14.
79. Castello, G., et al., *HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer*. *Clin Immunol*, 2010. **134**(3): p. 237-50.
80. Tsai, W.L. and R.T. Chung, *Viral hepatocarcinogenesis*. *Oncogene*, 2010. **29**(16): p. 2309-24.
81. Budhu, A. and X.W. Wang, *The role of cytokines in hepatocellular carcinoma*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(6): p. 1197-213.
82. Moriya, K., et al., *The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice*. *Nat Med*, 1998. **4**(9): p. 1065-7.
83. Lunel, F., et al., *Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(5): p. 1291-300.
84. Agnello, V., R.T. Chung, and L.M. Kaplan, *A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(21): p. 1490-5.
85. Lee, M.H., et al., *Chronic hepatitis C virus infection increases mortality from hepatic and extrahepatic diseases: a community-based long-term prospective study*. *J Infect Dis*, 2012. **206**(4): p. 469-77.
86. Fletcher, N.F., et al., *Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(3): p. 634-643 e6.
87. Norris, S., et al., *Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes*. *J Hepatol*, 1998. **28**(1): p. 84-90.
88. Crispe, I.N., *The liver as a lymphoid organ*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 147-63.
89. Riezu-Boj, J.I., et al., *Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection*. *J Hepatol*, 2011. **54**(3): p. 422-31.
90. Carpentier, A., et al., *Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(9): p. 2102-12.

91. Neumann, A.U., et al., *Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy*. Science, 1998. **282**(5386): p. 103-7.
92. Cox, A.L., et al., *Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1741-52.
93. Brimacombe, C.L., et al., *Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission*. J Virol, 2011. **85**(1): p. 596-605.
94. Saldanha, J., N. Lelie, and A. Heath, *Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA*. WHO Collaborative Study Group. Vox Sang, 1999. **76**(3): p. 149-58.
95. Houghton, M., *Discovery of the hepatitis C virus*. Liver Int, 2009. **29 Suppl 1**: p. 82-8.
96. Alter, H.J., et al., *Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis*. Lancet, 1978. **1**(8062): p. 459-63.
97. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, *Replication of hepatitis C virus*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 453-63.
98. Koonin, E.V., *The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses*. J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 9)**: p. 2197-206.
99. Colombo, M., et al., *Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma*. Lancet, 1989. **2**(8670): p. 1006-8.
100. Perking, J.A., *culturing hepatitis C: An unusual HCV strain opens the pathogen's entire life cycle to scrutiny*. The scientist-Magazine, 2006. **164A**(7): p. 1627-34.
101. Shimoike, T., et al., *Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 9718-25.
102. Baumert, T.F., et al., *Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3827-36.
103. Kaito, M., et al., *Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study*. J Gen Virol, 1994. **75 (Pt 7)**: p. 1755-60.
104. Maillard, P., et al., *Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients*. J Virol, 2001. **75**(17): p. 8240-50.
105. Walewski, J.L., et al., *Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame*. Rna, 2001. **7**(5): p. 710-21.
106. Grakoui, A., et al., *Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites*. J Virol, 1993. **67**(5): p. 2832-43.
107. Licursi, M., et al., *Promotion of Viral IRES-Mediated Translation Initiation under Mild Hypothermia*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126174.
108. Ito, T., S.M. Tahara, and M.M. Lai, *The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8789-96.
109. Kolykhalov, A.A., et al., *Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo*. J Virol, 2000. **74**(4): p. 2046-51.
110. Fraser, C.S. and J.A. Doudna, *Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 29-38.
111. Bradrick, S.S., R.W. Walters, and M. Gromeier, *The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(4): p. 1293-303.
112. Beales, L.P., D.J. Rowlands, and A. Holzenburg, *The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy*. Rna, 2001. **7**(5): p. 661-70.
113. Thibault, P.A., et al., *Regulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Xrn1 and MicroRNA-122 Binding to Individual Sites in the 5' Untranslated Region*. J Virol, 2015. **89**(12): p. 6294-311.
114. Peng, M., et al., *HIV Vpr protein up-regulates microRNA-122 expression and stimulates hepatitis C virus replication*. J Gen Virol, 2015.
115. Henke, J.I., et al., *microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA*. Embo J, 2008. **27**(24): p. 3300-10.
116. Nunes-Alves, C., *Viral pathogenesis: HCV RNA acts as a miR-122 sponge*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(5): p. 250.
117. Rehmann, B., *Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1745-54.
118. Honda, M., E.A. Brown, and S.M. Lemon, *Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA*. Rna, 1996. **2**(10): p. 955-68.
119. Khawaja, A., V. Vopalensky, and M. Pospisek, *Understanding the potential of hepatitis C virus internal ribosome entry site domains to modulate translation initiation via their structure and function*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2015. **6**(2): p. 211-24.

120. Kieft, J.S., et al., *The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold*. J Mol Biol, 1999. **292**(3): p. 513-29.
121. Ji, H., et al., *Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 16990-5.
122. Chamberlain, R.W., et al., *Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East*. J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 6)**: p. 1341-7.
123. Harada, S., et al., *Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells*. J Virol, 1991. **65**(6): p. 3015-21.
124. Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica, *Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3631-41.
125. Lo, S.Y., et al., *Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution*. Virology, 1994. **199**(1): p. 124-31.
126. Yasui, K., et al., *The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 6048-55.
127. Hundt, J., Z. Li, and Q. Liu, *Post-translational modifications of hepatitis C viral proteins and their biological significance*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(47): p. 8929-39.
128. Chang, S.C., et al., *Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(2): p. 1284-90.
129. Lo, S.Y., M.J. Selby, and J.H. Ou, *Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 5177-82.
130. Moriya, K., et al., *Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice*. J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 7)**: p. 1527-31.
131. Afzal, M.S., et al., *Hepatitis C virus capsid protein and intracellular lipids interplay and its association with hepatic steatosis*. Hepat Mon, 2014. **14**(8): p. e17812.
132. Kittlesen, D.J., et al., *Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation*. J Clin Invest, 2000. **106**(10): p. 1239-49.
133. Tu, Z., et al., *HCV core and NS3 proteins manipulate human blood-derived dendritic cell development and promote Th 17 differentiation*. Int Immunol, 2011. **24**(2): p. 97-106.
134. Lee, H.C., et al., *Hepatitis C virus promotes T-helper (Th)17 responses through thymic stromal lymphopoietin production by infected hepatocytes*. Hepatology, 2013. **57**(4): p. 1314-24.
135. Imran, M., et al., *Interaction of Hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors*. Virol J, 2012. **9**: p. 126.
136. Rajalakshmy, A.R., J. Malathi, and H.N. Madhavan, *Hepatitis C Virus NS3 Mediated Microglial Inflammation via TLR2/TLR6 MyD88/NF-kappaB Pathway and Toll Like Receptor Ligand Treatment Furnished Immune Tolerance*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125419.
137. Shiu, T.Y., et al., *Hepatitis C virus core protein down-regulates p21(Waf1/Cip1) and inhibits curcumin-induced apoptosis through microRNA-345 targeting in human hepatoma cells*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61089.
138. Cho, J., et al., *HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1538**(1): p. 59-66.
139. Alisi, A., et al., *Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms*. Oncogene, 2003. **22**(17): p. 2573-80.
140. Cho, J.W., et al., *Modulation of cell death sensitivity by mutant p53 in HCV core-expressing cells*. Int J Mol Med, 2005. **15**(3): p. 475-80.
141. Benzoubir, N., et al., *HCV core-mediated activation of latent TGF-beta via thrombospondin drives the crosstalk between hepatocytes and stromal environment*. J Hepatol, 2013. **59**(6): p. 1160-8.
142. Ripoli, M., et al., *Hypermethylated levels of E-cadherin promoter in Huh-7 cells expressing the HCV core protein*. Virus Res, 2011. **160**(1-2): p. 74-81.
143. Liu, J., et al., *Enhancement of canonical Wnt/beta-catenin signaling activity by HCV core protein promotes cell growth of hepatocellular carcinoma cells*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27496.
144. Inoue, K., et al., *Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **428**(4): p. 494-9.
145. Suzuki, R., et al., *Processing and functions of Hepatitis C virus proteins*. Intervirology, 1999. **42**(2-3): p. 145-52.
146. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 933-8.
147. Dubuisson, J., et al., *Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30605-9.
148. Op De Beeck, A., L. Cocquerel, and J. Dubuisson, *Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 11): p. 2589-95.

149. Lupberger, J., et al., *EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 589-95.
150. Cocquerel, L., et al., *Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 7): p. 1629-35.
151. Khan, A.G., et al., *Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2*. Nature, 2014. **509**(7500): p. 381-4.
152. Choukhi, A., et al., *Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3851-8.
153. Taylor, D.R., et al., *Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein*. Science, 1999. **285**(5424): p. 107-10.
154. Liberman, E., et al., *Activation of the grp78 and grp94 promoters by hepatitis C virus E2 envelope protein*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 3718-22.
155. Weiner, A.J., et al., *Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins*. Virology, 1991. **180**(2): p. 842-8.
156. Griffin, S.D., et al., *The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine*. FEBS Lett, 2003. **535**(1-3): p. 34-8.
157. Nieva, J.L., V. Madan, and L. Carrasco, *Viroporins: structure and biological functions*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(8): p. 563-74.
158. Carrere-Kremer, S., et al., *Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41384-92.
159. Jones, C.T., et al., *Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus*. J Virol, 2007. **81**(16): p. 8374-83.
160. Steinmann, E. and T. Pietschmann, *Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy*. Viruses, 2010. **2**(9): p. 2078-95.
161. Sakai, A., et al., *The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11646-51.
162. Wozniak, A.L., et al., *Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001087.
163. Gonzalez, M.E. and L. Carrasco, *Viroporins*. FEBS Lett, 2003. **552**(1): p. 28-34.
164. Popescu, C.I., et al., *NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001278.
165. Gentzsch, J., et al., *hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment*. PLoS Pathog, 2013. **9**(5): p. e1003355.
166. Jirasko, V., et al., *Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly*. PLoS Pathog, 2010. **6**(12): p. e1001233.
167. Dubuisson, J., *Hepatitis C virus proteins*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2406-15.
168. Santolini, E., et al., *The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7461-71.
169. Isken, O., et al., *A conserved NS3 surface patch orchestrates NS2 protease stimulation, NSSA hyperphosphorylation and HCV genome replication*. PLoS Pathog, 2015. **11**(3): p. e1004736.
170. Kazakov, T., et al., *Hepatitis C virus RNA replication depends on specific cis- and trans-acting activities of viral nonstructural proteins*. PLoS Pathog, 2015. **11**(4): p. e1004817.
171. Pallaoro, M., et al., *Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein*. J Virol, 2001. **75**(20): p. 9939-46.
172. Waxman, L., et al., *Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13931-5.
173. Lorenz, I.C., et al., *Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 831-5.
174. Yamaga, A.K. and J.H. Ou, *Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33228-34.
175. Welbourn, S., et al., *Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29604-11.
176. Dumoulin, F.L., et al., *Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines*. Virology, 2003. **305**(2): p. 260-6.
177. Pietschmann, T., et al., *Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7408-13.
178. Brass, V., et al., *An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8130-9.

179. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.
180. Shimizu, Y., et al., *Identification of the sequence on NS4A required for enhanced cleavage of the NS5A/5B site by hepatitis C virus NS3 protease*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 127-32.
181. Eisa, Z.M., *Subgenomic HCV RNA replication and its localization in the nucleus of the infected cells*. Saudi J Biol Sci, 2011. **18**(2): p. 213-8.
182. Shoji, I., et al., *Internal processing of hepatitis C virus NS3 protein*. Virology, 1999. **254**(2): p. 315-23.
183. Oshiumi, H., M. Matsumoto, and T. Seya, [*Chronic hepatitis C virus infection attenuates host antiviral innate immune response*]. Nihon Rinsho, 2015. **73**(2): p. 234-8.
184. Yang, L. and E. Seki, *Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 138.
185. Nitta, S., et al., *Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 46-58.
186. Kasama, Y., et al., *Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3*. Virus Res, 2012. **163**(1): p. 405-9.
187. Borowski, P., et al., *Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30722-8.
188. Nishikawa, S., F. Nishikawa, and K. Fukuda, *In vitro selection of RNA aptamers against HCV-NS3 helicase and their structural similarity with 3'(+)-UTR of HCV*. Nucleic Acids Res Suppl, 2003(3): p. 241-2.
189. Gu, M. and C.M. Rice, *Structures of hepatitis C virus nonstructural proteins required for replicase assembly and function*. Curr Opin Virol, 2013. **3**(2): p. 129-36.
190. Morgenstern, K.A., et al., *Polynucleotide modulation of the protease, nucleoside triphosphatase, and helicase activities of a hepatitis C virus NS3-NS4A complex isolated from transfected COS cells*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3767-75.
191. Deng, L., et al., *NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 6): p. 1703-13.
192. Kwun, H.J., et al., *p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 9): p. 2235-41.
193. Kwun, H.J. and K.L. Jang, *Dual effects of hepatitis C virus Core protein on the transcription of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene*. J Viral Hepat, 2003. **10**(4): p. 249-55.
194. Borowski, P., et al., *Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus*. J Clin Virol, 1999. **13**(1-2): p. 61-9.
195. Saalau-Bethell, S.M., et al., *Discovery of an allosteric mechanism for the regulation of HCV NS3 protein function*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(11): p. 920-5.
196. Asabe, S.I., et al., *The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 790-6.
197. Bartenschlager, R., et al., *Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5045-55.
198. David, N., et al., *The interaction between the hepatitis C proteins NS4B and NS5A is involved in viral replication*. Virology, 2015. **475**: p. 139-49.
199. Aligo, J., et al., *Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein*. Virology, 2009. **393**(1): p. 68-83.
200. Lundin, M., et al., *Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5428-38.
201. Lange, C.M., C. Sarrazin, and S. Zeuzem, *Review article: specifically targeted anti-viral therapy for hepatitis C - a new era in therapy*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(1): p. 14-28.
202. Romero-Brey, I., et al., *Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication*. PLoS Pathog, 2012. **8**(12): p. e1003056.
203. Palomares-Jerez, M.F., H. Nemesio, and J. Villalain, *Interaction with membranes of the full C-terminal domain of protein NS4B from hepatitis C virus*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(11): p. 2536-49.
204. Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann, *Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence*. Adv Virus Res, 2004. **63**: p. 71-180.
205. Hugle, T., et al., *The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein*. Virology, 2001. **284**(1): p. 70-81.
206. Hirota, M., et al., *Phosphorylation of nonstructural 5A protein of hepatitis C virus: HCV group-specific hyperphosphorylation*. Virology, 1999. **257**(1): p. 130-7.
207. Hoffman, B., Z. Li, and Q. Liu, *Down-Regulation of Viral RNA Translation by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Requires the PolyU/UC Sequence in the 3 Untranslated Region*. J Gen Virol, 2015.
208. Evans, M.J., C.M. Rice, and S.P. Goff, *Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 13038-43.

209. Ross-Thriepfand, D., J. Mankouri, and M. Harris, *Serine phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein controls the establishment of replication complexes*. J Virol, 2015. **89**(6): p. 3123-35.
210. Coito, C., et al., *High-throughput screening of the yeast kinome: identification of human serine/threonine protein kinases that phosphorylate the hepatitis C virus NS5A protein*. J Virol, 2004. **78**(7): p. 3502-13.
211. Ide, Y., et al., *Hepatitis C virus NS5A protein is phosphorylated in vitro by a stably bound protein kinase from HeLa cells and by cAMP-dependent protein kinase A-alpha catalytic subunit*. Gene, 1997. **201**(1-2): p. 151-8.
212. Kim, J., D. Lee, and J. Choe, *Hepatitis C virus NS5A protein is phosphorylated by casein kinase II*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(3): p. 777-81.
213. Reed, K.E., J. Xu, and C.M. Rice, *Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7187-97.
214. Macdonald, A. and M. Harris, *Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 9): p. 2485-502.
215. Tellinghuisen, T.L., et al., *The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 48576-87.
216. Gale, M., Jr., et al., *Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5208-18.
217. Moradpour, D., et al., *Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes*. J Virol, 2004. **78**(14): p. 7400-9.
218. Appel, N., et al., *Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000035.
219. Tamura, R., et al., *Hepatitis C Virus nonstructural 5A protein inhibits lipopolysaccharide-mediated apoptosis of hepatocytes by decreasing expression of Toll-like receptor 4*. J Infect Dis, 2011. **204**(5): p. 793-801.
220. Abe, T., et al., *Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 8953-66.
221. Machida, K., et al., *Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6*. J Virol, 2006. **80**(2): p. 866-74.
222. Ding, Q., et al., *Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin*. Mol Cell, 2005. **19**(2): p. 159-70.
223. Gregoire, D., et al., *Reply to: "Are Hedgehog and Wnt/beta-catenin pathways involved in hepatitis C virus-mediated EMT?": persistent activation of Hedgehog or Wnt/beta-catenin pathways is not involved in EMT mediated by HCV NS5A protein*. J Hepatol, 2013. **58**(3): p. 637-8.
224. Xiong, W., et al., *Vinexin beta interacts with Hepatitis C Virus NS5A modulating its hyperphosphorylation to regulate viral propagation*. J Virol, 2015.
225. Liu, Z., et al., *Mutations in the hepatitis C virus polymerase that increase RNA binding can confer resistance to cyclosporine A*. Hepatology, 2009. **50**(1): p. 25-33.
226. Zhang, P., et al., *De novo RNA synthesis and homology modeling of the classical swine fever virus RNA polymerase*. Virus Res, 2005. **112**(1-2): p. 9-23.
227. Morohashi, K., et al., *Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18285.
228. Lohmann, V., et al., *Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8416-28.
229. Bressanelli, S., et al., *Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13034-9.
230. Damien O'Farrell, R.T., Nicola Stock, Henric Ekstrand, Dave Rowlands and J. Jäger, *Structural and functional studies on Hepatitis C virus non-structural proteins*. Annual Report 2000 2000. **60**(7): p. 30-31.
231. Keating, G.M., *Ledipasvir/Sofosbuvir: a review of its use in chronic hepatitis C*. Drugs, 2015. **75**(6): p. 675-85.
232. Xu, X., et al., *Hepatitis C virus alternate reading frame protein decreases interferon-alpha secretion in peripheral blood mononuclear cells*. Mol Med Rep, 2014. **9**(2): p. 730-6.
233. Wu, W.B., et al., *Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells*. Intervirology, 2007. **50**(5): p. 341-6.
234. Zhu, D.Y., et al., *Potential Role of Hepatitis C Virus Alternate Reading Frame Protein in Negative Regulation of T-Bet Gene Expression*. Inflammation, 2015.
235. Hashempour, T., et al., *F protein increases CD4+CD25+ T cell population in patients with chronic hepatitis C*. Pathog Dis, 2015. **73**(4).
236. Ajorloo, M., et al., *Detection of Specific Antibodies to HCV-ARF/CORE+1 Protein in Cirrhotic and Non-Cirrhotic Patients with Hepatitis C: A Possible Association with Progressive Fibrosis*. Arch Iran Med, 2015. **18**(5): p. 304-7.
237. Echeverria, N., et al., *Hepatitis C virus genetic variability and evolution*. World J Hepatol, 2015. **7**(6): p. 831-45.

238. Mullan, B., et al., *Inferred hepatitis C virus quasispecies diversity is influenced by choice of DNA polymerase in reverse transcriptase-polymerase chain reactions*. *Anal Biochem*, 2001. **289**(2): p. 137-46.
239. Jackowiak, P., et al., *Phylogeny and molecular evolution of the hepatitis C virus*. *Infect Genet Evol*, 2014. **21**: p. 67-82.
240. Okamoto, H., et al., *Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources*. *J Gen Virol*, 1992. **73 (Pt 3)**: p. 673-9.
241. Simmonds, P., et al., *A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes*. *Hepatology*, 1994. **19**(5): p. 1321-4.
242. Robertson, B., et al., *Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization*. *International Committee on Virus Taxonomy*. *Arch Virol*, 1998. **143**(12): p. 2493-503.
243. Smith, D.B., et al., *Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource*. *Hepatology*, 2014. **59**(1): p. 318-27.
244. Kuiken, C. and P. Simmonds, *Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus*. *Methods Mol Biol*, 2009. **510**: p. 33-53.
245. Payan, C., et al., *Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millenium: The GEMHEP GenoCII Study*. *J Viral Hepat*, 2005. **12**(4): p. 405-13.
246. Simmonds, P., *Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 11): p. 3173-88.
247. Markov, P.V., et al., *Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa*. *J Gen Virol*, 2009. **90**(Pt 9): p. 2086-96.
248. Njouom, R., et al., *Phylogeography, risk factors and genetic history of hepatitis C virus in Gabon, central Africa*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e42002.
249. Pybus, O.G. and A. Rambaut, *Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(8): p. 540-50.
250. Murphy, D.G., et al., *Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa*. *J Clin Microbiol*, 2015. **53**(3): p. 967-72.
251. Ray, S.C., et al., *Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout egypt*. *J Infect Dis*, 2000. **182**(3): p. 698-707.
252. Abdel-Hamid, M., et al., *Genetic diversity in hepatitis C virus in Egypt and possible association with hepatocellular carcinoma*. *J Gen Virol*, 2007. **88**(Pt 5): p. 1526-31.
253. Ferenci, P., *Treatment of hepatitis C in difficult-to-treat patients*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015. **12**(5): p. 284-292.
254. Raziky, M.E., et al., *IP-10 Serum Level in Chronic Hepatitis C Virus Patients: Relation to Fibrosis and Response to Combined Interferon/Ribavirin Therapy*. *J Interferon Cytokine Res*, 2015.
255. Martell, M., et al., *Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution*. *J Virol*, 1992. **66**(5): p. 3225-9.
256. Morishima, C., et al., *Hepatitis C virus-specific immune responses and quasi-species variability at baseline are associated with nonresponse to antiviral therapy during advanced hepatitis C*. *J Infect Dis*, 2006. **193**(7): p. 931-40.
257. Clementi, M., *Intra-host genetic heterogeneity of hepatitis C virus and biomedical implications*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2003. **17**(2): p. 120-4.
258. Sarrazin, C., et al., *Clinical significance of in vitro replication-enhancing mutations of the hepatitis C virus (HCV) replicon in patients with chronic HCV infection*. *J Infect Dis*, 2005. **192**(10): p. 1710-9.
259. Dolan, P.T., et al., *Identification and comparative analysis of hepatitis C virus-host cell protein interactions*. *Mol Biosyst*, 2013. **9**(12): p. 3199-209.
260. Irshad, M., et al., *HCV-genotypes: a review on their origin, global status, assay system, pathogenecity and response to treatment*. *Hepatogastroenterology*, 2010. **57**(104): p. 1529-38.
261. Inokuchi, M., et al., *Lymphotropic hepatitis C virus has an interferon-resistant phenotype*. *J Viral Hepat*, 2012. **19**(4): p. 254-62.
262. Ding, Q., M. von Schaewen, and A. Ploss, *The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism*. *Cell Host Microbe*, 2014. **16**(5): p. 562-8.
263. Zaman, N., et al., *Presence of HCV RNA in peripheral blood mononuclear cells may predict patients response to interferon and ribavirin therapy*. *Ann Saudi Med*, 2014. **34**(5): p. 401-6.
264. Zignego, A.L., et al., *Virus-driven autoimmunity and lymphoproliferation: the example of HCV infection*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015. **11**(1): p. 15-31.
265. Calvaruso, V. and A. Craxi, *Immunological alterations in hepatitis C virus infection*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(47): p. 8916-23.

266. Pham, T.N. and T.I. Michalak, *Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(18): p. 2789-93.
267. Zehender, G., et al., *Compartmentalization of hepatitis C virus quasispecies in blood mononuclear cells of patients with mixed cryoglobulinemic syndrome*. *J Virol*, 2005. **79**(14): p. 9145-56.
268. Pawelczyk, A., et al., *Detection of hepatitis C virus (HCV) negative strand RNA and NS3 protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): CD3+, CD14+ and CD19+*. *Virol J*, 2013. **10**: p. 346.
269. Roque-Cuellar, M.C., et al., *Expression of CD81, SR-BI and LDLR in lymphocytes and monocytes from patients with classic and occult hepatitis C virus infection*. *J Med Virol*, 2012. **84**(11): p. 1727-36.
270. Sarhan, M.A., et al., *Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5*. *J Virol*, 2012. **86**(7): p. 3723-35.
271. Ducoulombier, D., et al., *Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes*. *Hepatology*, 2004. **39**(3): p. 817-25.
272. Forton, D.M., et al., *Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants*. *J Virol*, 2004. **78**(10): p. 5170-83.
273. Laporte, J., et al., *Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells*. *Blood*, 2003. **101**(1): p. 52-7.
274. Nielsen, S.U., et al., *Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients*. *J Virol*, 2006. **80**(5): p. 2418-28.
275. Khan, A.G., M.T. Miller, and J. Marcotrigiano, *HCV glycoprotein structures: what to expect from the unexpected*. *Curr Opin Virol*, 2015. **12**: p. 53-58.
276. Lin, L.T., et al., *Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry*. *BMC Microbiol*, 2013. **13**: p. 187.
277. Xu, Y., et al., *Characterization of hepatitis C virus interaction with heparan sulfate proteoglycans*. *J Virol*, 2015. **89**(7): p. 3846-58.
278. Lv, L.P., et al., *Hepatitis C virus infection of mouse hepatoma cell expressing human CD81 or LDLR*. *Acta Virol*, 2009. **53**(3): p. 185-9.
279. Sun, S., G. Jin, and H. Kang, *CD81 and CLDN1 polymorphisms and hepatitis C virus infection susceptibility: A case-control study*. *Gene*, 2015.
280. Haid, S., et al., *Isolate-dependent use of claudins for cell entry by hepatitis C virus*. *Hepatology*, 2014. **59**(1): p. 24-34.
281. Evans, M.J., et al., *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. *Nature*, 2007. **446**(7137): p. 801-5.
282. Liu, S., et al., *Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection*. *J Virol*, 2009. **83**(4): p. 2011-4.
283. Sainz, B., Jr., et al., *Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor*. *Nat Med*, 2012. **18**(2): p. 281-5.
284. Martin, D.N. and S.L. Uprichard, *Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(26): p. 10777-82.
285. Mason, C.P. and A.W. Tarr, *Human lectins and their roles in viral infections*. *Molecules*, 2015. **20**(2): p. 2229-71.
286. Zhang, S., et al., *CD81/CD9 tetraspanins aid plasmacytoid dendritic cells in recognition of hepatitis C virus-infected cells and induction of interferon-alpha*. *Hepatology*, 2013. **58**(3): p. 940-9.
287. Cai, Q., et al., *Distinct regions of human eIF3 are sufficient for binding to the HCV IRES and the 40S ribosomal subunit*. *J Mol Biol*, 2010. **403**(2): p. 185-96.
288. Zheng, A., et al., *Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus*. *J Virol*, 2007. **81**(22): p. 12465-71.
289. Bridge, S.H., et al., *PCSK9, apolipoprotein E and lipoviral particles in chronic hepatitis C genotype 3: evidence for genotype-specific regulation of lipoprotein metabolism*. *J Hepatol*, 2015. **62**(4): p. 763-70.
290. Boyer, A., et al., *The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(27): p. 18904-13.
291. Jiang, J., et al., *Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate*. *J Virol*, 2012. **86**(13): p. 7256-67.
292. Bankwitz, D., et al., *Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes*. *J Virol*, 2010. **84**(11): p. 5751-63.
293. Bartosch, B., et al., *An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies*. *J Virol*, 2005. **79**(13): p. 8217-29.
294. Pileri, P., et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. *Science*, 1998. **282**(5390): p. 938-41.

295. Ji, C., et al., *Prevention of hepatitis C virus infection and spread in human liver chimeric mice by an anti-CD81 monoclonal antibody*. Hepatology, 2015. **61**(4): p. 1136-44.
296. Helle, F., et al., *Permissivity of primary human hepatocytes and different hepatoma cell lines to cell culture adapted hepatitis C virus*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70809.
297. Furuse, M., et al., *Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin*. J Cell Biol, 1998. **141**(7): p. 1539-50.
298. Fofana, I., et al., *Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes*. Gastroenterology, 2010. **139**(3): p. 953-64, 964 e1-4.
299. von Hahn, T., S. Ciesek, and M.P. Manns, *Arrest all accessories--inhibition of hepatitis C virus by compounds that target host factors*. Discov Med, 2011. **12**(64): p. 237-44.
300. Krieger, S.E., et al., *Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1144-57.
301. Ploss, A., et al., *Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 882-6.
302. Benedicto, I., et al., *Clathrin mediates infectious hepatitis C virus particle egress*. J Virol, 2015. **89**(8): p. 4180-90.
303. Mee, C.J., et al., *Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells*. J Virol, 2009. **83**(12): p. 6211-21.
304. Matsuda, M., et al., *Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 12): p. 2658-67.
305. Wu, X., et al., *Cell death-inducing DFFA-like effector b is required for hepatitis C virus entry into hepatocytes*. J Virol, 2014. **88**(15): p. 8433-44.
306. Murakami, K., et al., *Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA*. Arch Virol, 2001. **146**(4): p. 729-41.
307. Reynolds, J.E., et al., *Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon*. Rna, 1996. **2**(9): p. 867-78.
308. Dreux, M., et al., *The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 14046-51.
309. Miyanari, Y., et al., *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(9): p. 1089-97.
310. Huang, H., et al., *Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(14): p. 5848-53.
311. Felmler, D.J., et al., *Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease*. Viruses, 2013. **5**(5): p. 1292-324.
312. Herker, E. and M. Ott, *Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(6): p. 241-8.
313. Liu, Z., et al., *Exosome-associated hepatitis C virus in cell cultures and patient plasma*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **455**(3-4): p. 218-22.
314. Douglas, D.N. and N.M. Kneteman, *Generation of improved mouse models for the study of hepatitis C virus*. Eur J Pharmacol, 2015. **759**: p. 313-325.
315. Ito, T., et al., *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, 1996. **77** (Pt 5): p. 1043-54.
316. Shimizu, Y.K., et al., *Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5477-81.
317. Shimizu, Y.K., et al., *Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6441-4.
318. Zubkova, I., et al., *Hepatitis C virus clearance correlates with HLA-DR expression on proliferating CD8+ T cells in immune-primed chimpanzees*. Hepatology, 2014. **59**(3): p. 803-13.
319. Bukh, J., *A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1469-75.
320. Veerapu, N.S., et al., *Trace amounts of sporadically reappearing HCV RNA can cause infection*. J Clin Invest, 2014. **124**(8): p. 3469-78.
321. Yang, M., et al., *Xanthohumol, a main prenylated chalcone from hops, reduces liver damage and modulates oxidative reaction and apoptosis in hepatitis C virus infected Tupaia belangeri*. Int Immunopharmacol, 2013. **16**(4): p. 466-74.
322. Zhao, X., et al., *Primary hepatocytes of Tupaia belangeri as a potential model for hepatitis C virus infection*. J Clin Invest, 2002. **109**(2): p. 221-32.
323. Amako, Y., et al., *Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia belangeri*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 303-11.

324. Ouyang, E.C., et al., *Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats*. World J Gastroenterol, 2001. **7**(3): p. 324-30.
325. Wu, G.Y., et al., *A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis*. Gastroenterology, 2005. **128**(5): p. 1416-23.
326. Waterston, R.H., et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 520-62.
327. Mercer, D.F., et al., *Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 927-33.
328. Bissig, K.D., et al., *Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment*. J Clin Invest, 2010. **120**(3): p. 924-30.
329. Georgel, P., et al., *Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies*. Trends Mol Med, 2010. **16**(6): p. 277-86.
330. Carcamo, W.C. and C.Q. Nguyen, *Advancement in the development of models for hepatitis C research*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 346761.
331. Dorner, M., et al., *Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice*. Nature, 2013. **501**(7466): p. 237-41.
332. Wang, Y., *Scotomas in molecular virology and epidemiology of hepatitis C virus*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(44): p. 7910-21.
333. Bility, M.T., A. Curtis, and L. Su, *A chimeric mouse model to study immunopathogenesis of HCV infection*. Methods Mol Biol, 2014. **1213**: p. 379-88.
334. Strick-Marchand, H., et al., *A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119820.
335. Vercauteren, K., Y.P. de Jong, and P. Meuleman, *HCV animal models and liver disease*. J Hepatol, 2014. **61**(1 Suppl): p. S26-33.
336. Deforges, S., et al., *Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 9): p. 2515-23.
337. Ndongo-Thiam, N., et al., *Long-term propagation of serum hepatitis C virus (HCV) with production of enveloped HCV particles in human HepaRG hepatocytes*. Hepatology, 2011. **54**(2): p. 406-17.
338. Kanda, T., et al., *Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4633-9.
339. Pichard-Garcia, L., et al., *Use of long-term cultures of human hepatocytes to study cytochrome P450 gene expression*. Methods Enzymol, 2002. **357**: p. 311-21.
340. Podevin, P., et al., *Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes*. Gastroenterology, 2010. **139**(4): p. 1355-64.
341. Lagaye, S., et al., *Efficient replication of primary or culture hepatitis C virus isolates in human liver slices: a relevant ex vivo model of liver infection*. Hepatology, 2012. **56**(3): p. 861-72.
342. Molina, S., et al., *Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 569-74.
343. Lohmann, V., et al., *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. Science, 1999. **285**(5424): p. 110-3.
344. Fukuhara, T., et al., *Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus*. Microbes Infect, 2011. **13**(4): p. 405-12.
345. Wu, X., et al., *Productive hepatitis C virus infection of stem cell-derived hepatocytes reveals a critical transition to viral permissiveness during differentiation*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002617.
346. Owsianka, A., et al., *Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 8): p. 1877-83.
347. Steinmann, D., et al., *Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9030-40.
348. Blanchard, E., et al., *Hepatitis C virus-like particle morphogenesis*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4073-9.
349. Ezelle, H.J., D. Markovic, and G.N. Barber, *Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector*. J Virol, 2002. **76**(23): p. 12325-34.
350. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset, *Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes*. J Exp Med, 2003. **197**(5): p. 633-42.
351. Bartosch, B., et al., *Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41624-30.
352. Zhang, K., et al., *[Development of infectious pseudo-particle harboring three subtypes hepatitis C virus glycoproteins and their application in neutralization assays]*. Bing Du Xue Bao, 2008. **24**(4): p. 287-94.
353. Hsu, M., et al., *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7271-6.

354. Pestka, J.M., et al., *Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(14): p. 6025-30.
355. Bartenschlager, R., *Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(11): p. 911-6.
356. Yoo, B.J., et al., *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, 1995. **69**(1): p. 32-8.
357. Bartenschlager, R., V. Lohmann, and F. Penin, *The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(7): p. 482-96.
358. Catanese, M.T. and M. Dorner, *Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo*. Virology, 2015. **479-480C**: p. 221-233.
359. Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice, *Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture*. Science, 2000. **290**(5498): p. 1972-4.
360. Lohmann, V., et al., *Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3007-19.
361. Scarselli, E., et al., *The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus*. Embo J, 2002. **21**(19): p. 5017-25.
362. Michalak, J.P., et al., *Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins*. J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 9)**: p. 2299-306.
363. Whidby, J., et al., *Blocking hepatitis C virus infection with recombinant form of envelope protein 2 ectodomain*. J Virol, 2009. **83**(21): p. 11078-89.
364. Lindenbach, B.D., et al., *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture*. Science, 2005. **309**(5734): p. 623-6.
365. Zhong, J., et al., *Robust hepatitis C virus infection in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9294-9.
366. Jones, C.T., et al., *Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(2): p. 167-71.
367. Blight, K.J., J.A. McKeating, and C.M. Rice, *Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 13001-14.
368. Lindenbach, B.D., et al., *Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3805-9.
369. Liang, T.J., et al., *Hepatitis B virus precore mutation and fulminant hepatitis in the United States. A polymerase chain reaction-based assay for the detection of specific mutation*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 550-5.
370. Magrin, S., et al., *Serum hepatitis C virus (HCV)-RNA and response to alpha-interferon in anti-HCV positive chronic hepatitis*. J Med Virol, 1992. **38**(3): p. 200-6.
371. Sauleda, S., et al., *Treatment with interferon plus ribavirin in anti-HIV negative patients with congenital coagulation disorders and chronic hepatitis C*. Thromb Haemost, 2000. **83**(6): p. 807-10.
372. Pascale, A. and L. Serfaty, *Triple therapy with first generation HCV protease inhibitors: lead-in or no lead-in phase?* J Hepatol, 2013. **58**(2): p. 391-4.
373. Reddy, K.R., et al., *Ledipasvir and sofosbuvir in patients with genotype 1 hepatitis C virus infection and compensated cirrhosis: An integrated safety and efficacy analysis*. Hepatology, 2015.
374. Bresci, G., et al., *Re-treatment of interferon-resistant patients with chronic hepatitis C with interferon-alpha*. J Viral Hepat, 1995. **2**(3): p. 155-8.
375. Westin, J., et al., *Monitoring virological responses to interferon-ribavirin and interferon monotherapy of chronic hepatitis C re-treated due to relapse or non-response*. Scand J Infect Dis, 2001. **33**(2): p. 110-5.
376. Curry, S., P. Qiu, and X. Tong, *Analysis of HCV resistance mutations during combination therapy with protease inhibitor boceprevir and PEG-IFN alpha-2b using TaqMan mismatch amplification mutation assay*. J Virol Methods, 2008. **153**(2): p. 156-62.
377. Romeo, R., M. Rumi, and M. Colombo, *Alpha interferon treatment of chronic hepatitis C*. Biomed Pharmacother, 1995. **49**(3): p. 111-5.
378. Zhu, Y. and S. Chen, *Antiviral treatment of hepatitis C virus infection and factors affecting efficacy*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(47): p. 8963-73.
379. Davis, G.L., et al., *Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C*. International Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med, 1998. **339**(21): p. 1493-9.
380. Nicot, F., et al., *Influence of HCV genotype 1 subtypes on the virus response to PEG interferon alpha-2a plus ribavirin therapy*. J Med Virol, 2011. **83**(3): p. 437-44.
381. McHutchison, J.G., et al., *Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C*. Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med, 1998. **339**(21): p. 1485-92.

382. *EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection.* J Hepatol. **60**(2): p. 392-420.
383. Poynard, T., et al., *Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus.* International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). Lancet, 1998. **352**(9138): p. 1426-32.
384. Deborah Friedman, N., et al., *Hepatitis C virus treatment in the 'real-world': how well do 'real' patients respond?* J Clin Exp Hepatol, 2014. **4**(3): p. 214-20.
385. Hegde, V.R., et al., *Two antiviral compounds from the plant Stylogne cauliflora as inhibitors of HCV NS3 protease.* Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(17): p. 2925-8.
386. Ogert, R.A., et al., *Resistance-associated amino acid variants associated with boceprevir plus pegylated interferon-alpha2b and ribavirin in patients with chronic hepatitis C in the SPRINT-1 trial.* Antivir Ther, 2013. **18**(3): p. 387-97.
387. Le, T.K., et al., *Treatment patterns, health care resource utilization, and costs in U.S. patients diagnosed with chronic hepatitis C infection who received telaprevir or boceprevir.* J Manag Care Spec Pharm, 2015. **21**(4): p. 308-18.
388. Vo, K.P., et al., *Poor Sustained Virological Response in a Multicenter Real-Life Cohort of Chronic Hepatitis C Patients Treated with Pegylated Interferon and Ribavirin plus Telaprevir or Boceprevir.* Dig Dis Sci, 2015. **60**(4): p. 1045-51.
389. Rauch, A., et al., *Host genetic determinants of spontaneous hepatitis C clearance.* Pharmacogenomics, 2009. **10**(11): p. 1819-37.
390. Sarrazin, C., et al., *Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 patients in the European region.* Antiviral Res, 2015. **116**: p. 10-6.
391. Dore, G.J. and J.J. Feld, *Hepatitis C virus therapeutic development: in pursuit of "perfectovir".* Clin Infect Dis, 2015. **60**(12): p. 1829-36.
392. *EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2014.* J Hepatol. **61**(2): p. 373-95.
393. Pawlotsky, J.M., *New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges.* Gastroenterology, 2014. **146**(5): p. 1176-92.
394. Lawitz, E., et al., *Sofosbuvir in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin for non-cirrhotic, treatment-naïve patients with genotypes 1, 2, and 3 hepatitis C infection: a randomised, double-blind, phase 2 trial.* Lancet Infect Dis, 2013. **13**(5): p. 401-8.
395. Cornberg, M., et al., *[New direct-acting antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis C in 2014].* Internist (Berl), 2014. **55**(4): p. 390-400.
396. Meissner, E.G., et al., *Endogenous intrahepatic IFNs and association with IFN-free HCV treatment outcome.* J Clin Invest, 2014. **124**(8): p. 3352-63.
397. M. Bourlière , J.B., Ch. Hézode , D. Larrey , V. de Lédighen , V. Leroy , S. Pol , L. Serfaty (Paris) – A. Tran (Nice and F. Zoulim, *Traitement des hépatites virales C Avis d'experts 5* Association française pour l'étude du foie, 2015. **46**(4): p. 393-7.
398. Araz, F., C.M. Durand, and A. Gurakar, *New modalities in the treatment of HCV in pre and post - transplantation setting.* Turk J Gastroenterol, 2015. **26**(3): p. 204-213.
399. Leleu, H., M. Blachier, and I. Rosa, *Cost-effectiveness of sofosbuvir in the treatment of patients with hepatitis C.* J Viral Hepat, 2015. **22**(4): p. 376-83.
400. JORF, n., *Avis relatif aux prix de spécialités pharmaceutiques publiés en application de l'article L. 162-16-5 du code de la sécurité sociale* legifrance.gov.fr ; le service public de la diffusion du droit, 2014. **texte n° 84**(4): p. 19489
401. Everson, G.T., et al., *A randomized controlled trial of pretransplant antiviral therapy to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation.* Hepatology, 2013. **57**(5): p. 1752-62.
402. Manns, M.P. and T. von Hahn, *Novel therapies for hepatitis C - one pill fits all?* Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(8): p. 595-610.
403. Folgori, A., et al., *A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees.* Nat Med, 2006. **12**(2): p. 190-7.
404. Swadling, L., et al., *A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory.* Sci Transl Med, 2014. **6**(261): p. 261ra153.
405. Beaumont, E. and P. Roingard, *Chimeric hepatitis B virus (HBV)/hepatitis C virus (HCV) subviral envelope particles induce efficient anti-HCV antibody production in animals pre-immunized with HBV vaccine.* Vaccine, 2015. **33**(8): p. 973-6.
406. Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon, *Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups.* Lancet, 1997. **349**(9055): p. 825-32.
407. Di Martino, V., et al., *Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure.* Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1426-33.

408. Nouredin, M., et al., *Association of IL28B genotype with fibrosis progression and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C: a longitudinal analysis*. *Hepatology*, 2013. **58**(5): p. 1548-57.
409. Balagopal, A., D.L. Thomas, and C.L. Thio, *IL28B and the control of hepatitis C virus infection*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(6): p. 1865-76.
410. Lechner, F., et al., *Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus*. *J Exp Med*, 2000. **191**(9): p. 1499-512.
411. Pawlotsky, J.M., [*Hepatitis C virus and immune response*]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2001. **25**(4 Suppl): p. B123-33.
412. Ando, K., et al., *Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL*. *J Immunol*, 1997. **158**(11): p. 5283-91.
413. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(5): p. 373-84.
414. Rydzynski, C., et al., *Generation of cellular immune memory and B-cell immunity is impaired by natural killer cells*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6375.
415. Parker, D.C., *T cell-dependent B cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 331-60.
416. Rousseau, M., et al., *Study of the role of cytosolic phospholipase A2 alpha in eicosanoid generation and thymocyte maturation in the thymus*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0126204.
417. Cowan, J.E., W.E. Jenkinson, and G. Anderson, *Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant gamma delta T cells, and invariant NKT cells: what we learn from intrathymic migration*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(3): p. 652-60.
418. O'Reilly, R.J., et al., *T-cell depleted allogeneic hematopoietic cell transplants as a platform for adoptive therapy with leukemia selective or virus-specific T-cells*. *Bone Marrow Transplant*, 2015. **50**(S2): p. S43-S50.
419. Pakker, N.G., et al., *Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation*. *Nat Med*, 1998. **4**(2): p. 208-14.
420. Fisher, J., et al., *Non-V delta 2 gamma delta T lymphocytes as effectors of cancer immunotherapy*. *Oncoimmunology*, 2014. **4**(3): p. e973808.
421. Collins, A., D.R. Littman, and I. Taniuchi, *RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(2): p. 106-15.
422. Sebзда, E., et al., *Selection of the T cell repertoire*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 829-74.
423. Barra, M.M., et al., *Premature expression of foxp3 in double-negative thymocytes*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0127038.
424. von Freeden-Jeffry, U., et al., *The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression*. *Immunity*, 1997. **7**(1): p. 147-54.
425. Chen, J., et al., *Protective efficacy of Toxoplasma gondii calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) adjuvated with recombinant IL-15 and IL-21 against experimental toxoplasmosis in mice*. *BMC Infect Dis*, 2014. **14**: p. 487.
426. Guy Gorochov, J.D.L., Gilles Thibault, Antoine Toubert, *Origine, différenciation et répertoire lymphocytaire T*. 1997. **13**(4): p. 375-9.
427. de Villartay, J.P., *Congenital defects in V(D)J recombination*. *Br Med Bull*, 2015. **114**(1): p. 157-67.
428. Kumar, A., et al., *Understanding V(D)J recombination initiator RAG1 gene using molecular phylogenetic and genetic variant analyses and upgrading missense and non-coding variants of clinical importance*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015.
429. Clemens, E.B., et al., *Fixed expression of single influenza virus-specific TCR chains demonstrates the capacity for TCR alpha- and beta-chain diversity in the face of peptide-MHC class I specificity*. *J Immunol*, 2015. **194**(3): p. 898-910.
430. Elhanati, Y., et al., *Quantifying selection in immune receptor repertoires*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(27): p. 9875-80.
431. Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, and R. Berga-Bolanos, *Transcription factors and target genes of pre-TCR signaling*. *Cell Mol Life Sci*, 2015. **72**(12): p. 2305-21.
432. Boo, K., S.H. Baek, and H. Lee, *Pontin is required for pre-TCR signaling at the beta-selection checkpoint in T cell development*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **447**(1): p. 44-50.
433. Serrano-Candelas, E., et al., *RCAN 1 and 3 proteins regulate thymic positive selection*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **460**(2): p. 295-301.
434. Klausmann, S., et al., *T-cell reprogramming through targeted CD4-coreceptor and T-cell receptor expression on maturing thymocytes by latent Circoviridae family member porcine circovirus type 2 cell infections in the thymus*. *Emerg Microbes Infect*, 2015. **4**(3): p. e15.
435. Coder, B.D., et al., *Thymic Involution Perturbs Negative Selection Leading to Autoreactive T Cells That Induce Chronic Inflammation*. *J Immunol*, 2015.
436. Gardner, J.M., et al., *AIRE in the thymus and beyond*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(6): p. 582-9.

437. Xu, X., et al., *Retention and tolerance of autoreactive CD4(+) recent thymic emigrants in the liver*. J Autoimmun, 2015. **56**: p. 87-97.
438. Thorlacius-Ussing, G., et al., *Auto-reactive T cells revised. Overestimation based on methodology?* J Immunol Methods, 2015. **420**: p. 56-9.
439. Franz, D., et al., *Dopamine receptors D3 and D5 regulate CD4(+)T-cell activation and differentiation by modulating ERK activation and cAMP production*. J Neuroimmunol. **284**: p. 18-29.
440. Santos, R.F., L. Oliveira, and A.M. Carmo, *Tuning T cell activation: the function of CD6 at the immunological synapse and in T cell responses*. Curr Drug Targets, 2015.
441. Kiniwa, Y., et al., *Identification of DRG-1 As a Melanoma-Associated Antigen Recognized by CD4+ Th1 Cells*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0124094.
442. Kloverpris, H.N., et al., *CD8+ TCR Bias and Immunodominance in HIV-1 Infection*. J Immunol, 2015. **194**(11): p. 5329-45.
443. Kuhns, M.S., M.M. Davis, and K.C. Garcia, *Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 133-9.
444. Gascoigne, N.R., *Do T cells need endogenous peptides for activation?* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(11): p. 895-900.
445. Finetti, F., A. Onnis, and C.T. Baldari, *Regulation of vesicular traffic at the T cell immune synapse: lessons from the primary cilium*. Traffic, 2015. **16**(3): p. 241-9.
446. Amon, M.A. and N. Manolios, *Hypothesis: TCR signal transduction--A novel tri-modular signaling system*. Mol Immunol, 2008. **45**(4): p. 876-80.
447. Yin, Y., X.X. Wang, and R.A. Mariuzza, *Crystal structure of a complete ternary complex of T-cell receptor, peptide-MHC, and CD4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(14): p. 5405-10.
448. Sorice, M., et al., *Association between GM3 and CD4-Ick complex in human peripheral blood lymphocytes*. Glycoconj J, 2000. **17**(3 -4): p. 247-52.
449. Kumar, S., et al., *Disruption of HLA-DR raft, deregulations of Lck-ZAP-70-Cbl-b cross-talk and miR181a towards T cell hyporesponsiveness in leprosy*. Mol Immunol, 2011. **48**(9-10): p. 1178-90.
450. Bacchetta, R., et al., *Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1713-22.
451. Vang, T., et al., *Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity*. Autoimmunity, 2007. **40**(6): p. 453-61.
452. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2715-29.
453. Crispin, J.C. and G.C. Tsokos, *Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(3): p. 190-5.
454. Isakov, N. and A. Altman, *Protein kinase C(theta) in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 761-94.
455. Carr, E.L., et al., *Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 1037-44.
456. Yoshida, T., et al., *The Impact of c-Fos/Activator Protein-1 Inhibition on Allogeneic Pancreatic Islet Transplantation*. Am J Transplant, 2015.
457. Beals, C.R., et al., *Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction*. Genes Dev, 1997. **11**(7): p. 824-34.
458. Garabtree, G., *expression des gènes après formation du complexe CMH/Ag*. www.ulg.ac.be/medint/cours8.ppt. **13**(4): p. 375-9.
459. Delhem, N., et al., *Primary Th1 cell immunization against HIVgp160 in SCID-hu mice coengrafted with peripheral blood lymphocytes and skin*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 2060-9.
460. Xing, L., et al., *CD8+HLA-DR+ T cells are increased in patients with severe aplastic anemia*. Mol Med Rep, 2014. **10**(3): p. 1252-8.
461. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *To kill or to cure: options in host defense against viral infection*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(4): p. 478-83.
462. Murray, H.W., et al., *Granzyme-mediated regulation of host defense in the liver in experimental Leishmania donovani infection*. Infect Immun, 2015. **83**(2): p. 702-12.
463. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 65-91.
464. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 4-12.
465. Thakur, R., et al., *Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells?* Front Microbiol, 2015. **6**: p. 429.
466. Araujo-Pires, A.C., et al., *Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status*. J Appl Oral Sci, 2014. **22**(4): p. 336-46.

467. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
468. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 713-58.
469. Lemoine, S., et al., *Dectin-1 activation unlocks IL12A expression and reveals the T1 potency of neonatal dendritic cells*. J Allergy Clin Immunol, 2015.
470. Simonovic, S.Z., et al., *Cytokine production in peripheral blood cells of patients with differentiated thyroid cancer: elevated Th2/Th9 cytokine production before and reduced Th2 cytokine production after radioactive iodine therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(1): p. 75-82.
471. O'Garra, A., *Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 275-83.
472. Egli, A., et al., *The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections*. Emerg Microbes Infect, 2014. **3**(7): p. e51.
473. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 5-17.
474. Leung, S., et al., *The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(3): p. 182-9.
475. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
476. Hou, N., et al., *Tim-3-induces Th2-biased immunity and alternative macrophage activation during Schistosoma japonicum infection*. Infect Immun, 2015.
477. Savetsky, I.L., et al., *Th2 cytokines inhibit lymphangiogenesis*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0126908.
478. Jacobsen, E.A., et al., *Differential Activation of Airway Eosinophils Induces IL-13 Mediated Allergic Th2 Pulmonary Responses in Mice*. Allergy, 2015.
479. Drake, L.Y., et al., *B cells play key roles in th2-type airway immune responses in mice exposed to natural airborne allergens*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121660.
480. Wareham, A.S., et al., *Evidence for a role for interleukin-17, Th17 cells and iron homeostasis in protective immunity against tuberculosis in cynomolgus macaques*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88149.
481. Dong, C., *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 337-48.
482. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
483. Chung, Y., et al., *Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 576-87.
484. Chung, Y. and C. Dong, *Don't leave home without it: the IL-23 visa to T(H)-17 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(3): p. 236-8.
485. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
486. Moudgil, K.D., *Interplay among cytokines and T cell subsets in the progression and control of immune-mediated diseases*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 1-4.
487. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
488. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
489. Gogishvili, T., et al., *Cell-intrinsic and -extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion*. Eur J Immunol, 2013. **43**(1): p. 188-93.
490. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
491. Miyara, M., Y. Ito, and S. Sakaguchi, *TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(9): p. 543-51.
492. Sakaguchi, S., et al., *The plasticity and stability of regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 461-7.
493. Tahir, S., et al., *A CD153+CD4+ T Follicular Cell Population with Cell-Senescence Features Plays a Crucial Role in Lupus Pathogenesis via Osteopontin Production*. J Immunol, 2015.
494. Yang, J., et al., *Interleukin-9 is associated with elevated anti-double-stranded DNA antibodies in lupus-prone mice*. Mol Med, 2015.
495. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 207-14.
496. Wang, J.Y., et al., *[Determination of Th9 cells and IL-9 in children with Mycoplasma pneumoniae infection]*. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2015. **17**(4): p. 308-11.

497. Ahlfors, H., et al., *IL-22 fate reporter reveals origin and control of IL-22 production in homeostasis and infection*. *J Immunol*, 2015. **193**(9): p. 4602-13.
498. King, C., S.G. Tangye, and C.R. Mackay, *T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2008. **26**: p. 741-66.
499. Annunziato, F. and S. Romagnani, *Heterogeneity of human effector CD4+ T cells*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(6): p. 257.
500. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 646-55.
501. Horner, S.M. and M. Gale, Jr., *Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus*. *Nat Med*, 2013. **19**(7): p. 879-88.
502. Heim, M.H., *25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: an epoch coming to an end*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(7): p. 535-42.
503. Rehmann, B., et al., *Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients*. *J Virol*, 1996. **70**(10): p. 7092-102.
504. Pape, G.R., et al., *Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus*. *J Viral Hepat*, 1999. **6 Suppl 1**: p. 36-40.
505. Farci, P., et al., *Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus*. *Science*, 1992. **258**(5079): p. 135-40.
506. Heim, M.H. and R. Thimme, *Innate and adaptive immune responses in HCV infections*. *J Hepatol*, 2014. **61**(1 Suppl): p. S14-25.
507. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
508. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. *Int Rev Immunol*, 2011. **30**(1): p. 16-34.
509. Dolganiuc, A., et al., *Distinct Toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(8): p. 1198-204.
510. Lemon, S.M., *Induction and evasion of innate antiviral responses by hepatitis C virus*. *J Biol Chem*, 2011. **285**(30): p. 22741-7.
511. Hoffmann, M., et al., *Toll-like receptor 2 senses hepatitis C virus core protein but not infectious viral particles*. *J Innate Immun*, 2009. **1**(5): p. 446-54.
512. Marcello, T., et al., *Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(6): p. 1887-98.
513. Der, S.D., et al., *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15623-8.
514. Tilg, H., *New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(3): p. 1017-21.
515. Sarasin-Filipowicz, M., et al., *Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(19): p. 7034-9.
516. Stone, A.E., et al., *Hepatitis C virus pathogen associated molecular pattern (PAMP) triggers production of lambda-interferons by human plasmacytoid dendritic cells*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(4): p. e1003316.
517. Chen, Y.L., et al., *A type I IFN-Flt3 ligand axis augments plasmacytoid dendritic cell development from common lymphoid progenitors*. *J Exp Med*, 2013. **210**(12): p. 2515-22.
518. Averill, L., W.M. Lee, and N.J. Karandikar, *Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection*. *Clin Immunol*, 2007. **123**(1): p. 40-9.
519. Perrella, A., et al., *Flow cytometry assay of myeloid dendritic cells (mDCs) in peripheral blood during acute hepatitis C: possible pathogenetic mechanisms*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(7): p. 1105-9.
520. Ulsenheimer, A., et al., *Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection*. *Hepatology*, 2005. **41**(3): p. 643-51.
521. Takahashi, K., et al., *Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(16): p. 7431-6.
522. Kanto, T., et al., *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*, 2004. **190**(11): p. 1919-26.
523. Dolganiuc, A., et al., *Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 6758-68.
524. Krishnadas, D.K., et al., *HCV-core and NS3 antigens play disparate role in inducing regulatory or effector T cells in vivo: Implications for viral persistence or clearance*. *Vaccine*. **28**(9): p. 2104-14.
525. Dolganiuc, A., et al., *Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation*. *J Immunol*, 2003. **170**(11): p. 5615-24.

526. Aroucha, D.C., et al., *High tumor necrosis factor-alpha/interleukin-10 ratio is associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C*. *Cytokine*, 2013. **62**(3): p. 421-5.
527. Dolganiuc, A., et al., *Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(6): p. 2119-27.
528. Agaoglu, S., et al., *Hepatitis C lipo-virus-particle from chronically infected patients interferes with TLR4 signaling in dendritic cell*. *PLoS One*, 2007. **2**(3): p. e330.
529. Szabo, G. and A. Dolganiuc, *Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection*. *Immunobiology*, 2005. **210**(2-4): p. 237-47.
530. Longman, R.S., et al., *Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus*. *Blood*, 2004. **103**(3): p. 1026-9.
531. Larsson, M., et al., *Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus*. *J Virol*, 2004. **78**(12): p. 6151-61.
532. Jinushi, M., et al., *Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection*. *J Immunol*, 2003. **170**(3): p. 1249-56.
533. Chattergoon, M.A., et al., *HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type 1 interferon*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(5): p. e1004082.
534. Revie, D. and S.Z. Salahuddin, *Role of macrophages and monocytes in hepatitis C virus infections*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(11): p. 2777-84.
535. Preisser, L., et al., *IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells*. *Hepatology*, 2014. **60**(6): p. 1879-90.
536. Meier, U.C., et al., *Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections*. *J Virol*, 2005. **79**(19): p. 12365-74.
537. Deignan, T., et al., *Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection*. *J Hepatol*, 2002. **37**(1): p. 101-8.
538. Golden-Mason, L. and H.R. Rosen, *Natural killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies?* *Liver Transpl*, 2006. **12**(3): p. 363-72.
539. Tseng, C.T. and G.R. Klimpel, *Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions*. *J Exp Med*, 2002. **195**(1): p. 43-9.
540. Rogalska-Taranta, M., et al., *Altered effector functions of NK cells in chronic hepatitis C are associated with IFNL3 polymorphism*. *J Leukoc Biol*, 2015.
541. Gao, B. and S. Radaeva, *Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1832**(7): p. 1061-9.
542. Nattermann, J., et al., *The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(2): p. 443-53.
543. Su, Z.J., et al., *Changes in the balance between Treg and Th17 cells in patients with chronic hepatitis B*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013. **76**(4): p. 437-44.
544. Sene, D., et al., *Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(11): p. e1001184.
545. Nuti, S., et al., *Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(11): p. 3448-55.
546. Valiante, N.M., et al., *Life, activation and death of intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C*. *Immunol Rev*, 2000. **174**: p. 77-89.
547. Doherty, D.G., et al., *The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns*. *J Immunol*, 1999. **163**(4): p. 2314-21.
548. Doherty, D.G. and C. O'Farrelly, *Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver*. *Immunol Rev*, 2000. **174**: p. 5-20.
549. Oliveira, I.S., et al., *Serum levels of immunoglobulin free light chains in patients with chronic hepatitis C presenting cryoglobulinemia*. *Braz J Infect Dis*, 2014. **18**(6): p. 638-42.
550. A. Fournillier-Jacob, M.G., C. Wychowski, *Infection par le virus de l'hépatite C et réponse immunitaire : application au diagnostic et à la vaccination* *Virologie*, 1997. **1**(3): p. 217-28.
551. Rosa, D., et al., *A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 1759-63.
552. Yokozaki, S., et al., *Immunologic dynamics in hemophiliac patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: influence of antiretroviral therapy*. *Blood*, 2000. **96**(13): p. 4293-9.

553. Farci, P., et al., *Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15394-9.
554. Shimizu, Y.K., et al., *A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures*. Virology, 1996. **223**(2): p. 409-12.
555. Kojima, M., et al., *Influence of antibodies to the hypervariable region of E2/NS1 glycoprotein on the selective replication of hepatitis C virus in chimpanzees*. Virology, 1994. **204**(2): p. 665-72.
556. Weiner, A.J., et al., *Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3468-72.
557. Pawlotsky, J.M., *Hepatitis C: virology, clinical aspects and the relation to cryoglobulinemia*. Acta Gastroenterol Belg, 2000. **63**(2): p. 200-1.
558. Zhang, S., et al., *Frequency, private specificity and cross-reactivity of pre-existing HCV-specific CD8+ T cells in HCV seronegative individuals: implication for vaccine responses*. J Virol, 2015.
559. Lokhande, M.U., et al., *Methodologies for the Analysis of HCV-Specific CD4(+) T Cells*. Front Immunol. **6**: p. 57.
560. Canning, C., et al., *Liver immunity and tumour surveillance*. Immunol Lett, 2006. **107**(2): p. 83-8.
561. MacDonald, H.R., *Development and selection of NKT cells*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 250-4.
562. Morishima, C., et al., *Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing*. Hepatology, 2006. **43**(3): p. 573-80.
563. Kawarabayashi, N., et al., *Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2000. **32**(5): p. 962-9.
564. Pernollet, M., et al., *Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions*. Clin Exp Immunol, 2002. **130**(3): p. 518-25.
565. Gonzalez, L.R., et al., *Increased number of non-invariant NKT cells and low number of circulating CD1-expressing leukocytes in patients infected with hepatitis C virus*. Ann Biol Clin (Paris), 2012. **70**(6): p. 695-701.
566. Exley, M.A., et al., *Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1519-23.
567. Bertolino, P., G. Klimpel, and S.M. Lemon, *Hepatic inflammation and immunity: a summary of a conference on the function of the immune system within the liver*. Hepatology, 2000. **31**(6): p. 1374-8.
568. Nikolopoulou, V., et al., *An increased number of circulating gamma/delta TCR + T cells in patients with chronic viral hepatitis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995. **10**(2): p. 115-8.
569. Tseng, C.T., et al., *Characterization of liver T-cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections*. Hepatology, 2001. **33**(5): p. 1312-20.
570. Agrati, C., et al., *Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons*. Mol Med, 2001. **7**(1): p. 11-9.
571. Par, G., et al., *Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 Tcr+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection*. J Hepatol, 2002. **37**(4): p. 514-22.
572. Hayday, A. and R. Tigelaar, *Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 233-42.
573. Sansonno, D., P. Procaccio, and F. Dammacco, *Kinetics of anti-hepatitis C virus response during acute hepatitis in an immunosuppressed HCV chronically infected patient*. Digestion, 1991. **50**(1): p. 52-60.
574. Imawari, M., et al., *Establishment of a human T-cell clone cytotoxic for both autologous and allogeneic hepatocytes from chronic hepatitis patients with type non-A, non-B virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2883-7.
575. Kita, H., et al., *HLA B44-restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope on hepatitis C virus nucleocapsid protein*. Hepatology, 1993. **18**(5): p. 1039-44.
576. Abdel-Hakeem, M.S. and N.H. Shoukry, *Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 274.
577. Owusu Sekyere, S., et al., *A heterogeneous hierarchy of co-regulatory receptors regulates exhaustion of HCV-specific CD8 T cells in patients with chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2015. **62**(1): p. 31-40.
578. Chang, K.M., et al., *Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2376-85.
579. Nelson, D.R., et al., *The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C*. J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1473-81.
580. Larrubia, J.R., et al., *HCV-specific CD8+ cell detection at week 12 of chronic hepatitis C treatment with PEG-interferon-alpha2b/ribavirin correlates with infection resolution*. Cell Immunol, 2013. **286**(1-2): p. 31-8.

581. Antonaci, S. and O. Schiraldi, *Costimulatory molecules and cytotoxic T cells in chronic hepatitis C: defence mechanisms devoted to host integrity or harmful events favouring liver injury progression? A review.* Immunopharmacol Immunotoxicol, 1998. **20**(4): p. 455-72.
582. Cerny, A., et al., *Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA A2.1 binding motif.* J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 521-30.
583. Pasetto, A., et al., *Generation of T-cell receptors targeting a genetically stable and immunodominant cytotoxic T-lymphocyte epitope within hepatitis C virus non-structural protein 3.* J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 2): p. 247-58.
584. Oniangue-Ndza, C., et al., *Compensatory mutations restore the replication defects caused by cytotoxic T lymphocyte escape mutations in hepatitis C virus polymerase.* J Virol, 2011. **85**(22): p. 11883-90.
585. Gruener, N.H., et al., *Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus.* J Virol, 2001. **75**(12): p. 5550-8.
586. Sobao, Y., et al., *Visual demonstration of hepatitis C virus-specific memory CD8(+) T-cell expansion in patients with acute hepatitis C.* Hepatology, 2001. **33**(1): p. 287-94.
587. Cameron, B., et al., *Correlates and characteristics of hepatitis C virus-specific T-cell immunity in exposed uninfected high-risk prison inmates.* J Viral Hepat, 2012. **20**(4): p. e96-106.
588. Li, S., et al., *Hepatitis C virus-specific T-cell-derived transforming growth factor beta is associated with slow hepatic fibrogenesis.* Hepatology. **56**(6): p. 2094-105.
589. Gruner, N.H., et al., *Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C.* J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1528-36.
590. Bain, C., et al., *Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection.* Gastroenterology, 2001. **120**(2): p. 512-24.
591. Houldsworth, A., et al., *Haplotype analysis finds linkage disequilibrium in the IL-12 gene in patients with HCV.* J Med Virol, 2015. **87**(7): p. 1207-17.
592. Barathan, M., et al., *Chronic hepatitis C virus infection triggers spontaneous differential expression of biosignatures associated with T cell exhaustion and apoptosis signaling in peripheral blood mononucleocytes.* Apoptosis, 2015. **20**(4): p. 466-80.
593. Spaan, M., et al., *CD4+ CXCR5+ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses.* J Hepatol, 2014. **62**(2): p. 303-10.
594. Gerlach, J.T., et al., *Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins.* J Virol, 2005. **79**(19): p. 12425-33.
595. Cusick, M.F., et al., *Naturally occurring CD4+ T-cell epitope variants act as altered peptide ligands leading to impaired helper T-cell responses in hepatitis C virus infection.* Hum Immunol, 2011. **72**(5): p. 379-85.
596. Rosen, H.R., et al., *Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages.* Hepatology, 2002. **35**(1): p. 190-8.
597. Missale, G., et al., *Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response.* J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 706-14.
598. Anderson, J.P., et al., *CD4 recovery on antiretroviral therapy is associated with decreased progression to liver disease among hepatitis C virus-infected injecting drug users.* Open Forum Infect Dis, 2015. **2**(1): p. ofv019.
599. Botarelli, P., et al., *T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection.* Gastroenterology, 1993. **104**(2): p. 580-7.
600. Cramp, M.E., et al., *Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia.* Gut, 1999. **44**(3): p. 424-9.
601. Cooper, S., et al., *Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus.* Immunity, 1999. **10**(4): p. 439-49.
602. Bertoletti, A., et al., *Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections.* Gastroenterology, 1997. **112**(1): p. 193-9.
603. Vanis, N., A. Mehmedovic, and R. Mesihovic, *Use of serum levels of proinflammatory cytokine IL-1alpha in chronic hepatitis C.* Coll Antropol, 2015. **39**(1): p. 75-9.
604. Pimentel, J.P., et al., *Anti-inflammatory/regulatory cytokine microenvironment mediated by IL-4 and IL-10 coordinates the immune response in hemophilia A patients infected chronically with hepatitis C virus.* J Med Virol, 2013. **85**(6): p. 1009-18.
605. Mousa, N., et al., *Cytokine profiles and hepatic injury in occult hepatitis C versus chronic hepatitis C virus infection.* Int J Immunopathol Pharmacol, 2014. **27**(1): p. 87-96.
606. Napoli, J., et al., *Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines.* Hepatology, 1996. **24**(4): p. 759-65.
607. Serra, A., et al., *Coligation of the hepatitis C virus receptor CD81 with CD28 primes naive T lymphocytes to acquire type 2 effector function.* J Immunol, 2008. **181**(1): p. 174-85.
608. Krishnadas, D.K., et al., *Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms.* Int Immunol, 2010. **22**(6): p. 491-502.

609. Battegay, M., et al., *Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus-encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecules*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2462-70.
610. Delhem, N., et al., *[Regulatory T-cells and hepatocellular carcinoma: implication of the regulatory T lymphocytes in the control of the immune response]*. Bull Cancer, 2008. **95**(12): p. 1219-25.
611. Delhem, N., et al., *[Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression]*. Bull Cancer, 2008. **95**(11): p. 1029-38.
612. Nishizuka, Y. and T. Sakakura, *Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice*. Science, 1969. **166**(3906): p. 753-5.
613. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
614. Sakaguchi, S., et al., *Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease*. J Exp Med, 1985. **161**(1): p. 72-87.
615. Fowell, D. and D. Mason, *Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential*. J Exp Med, 1993. **177**(3): p. 627-36.
616. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
617. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
618. Kalathil, S., et al., *Higher frequencies of GARP(+)CTLA-4(+)Foxp3(+) T regulatory cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients are associated with impaired T-cell functionality*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2435-44.
619. Valdor, R. and F. Macian, *Induction and stability of the anergic phenotype in T cells*. Semin Immunol, 2013. **25**(4): p. 313-20.
620. Laass, M.W., et al., *Loss and Gain of Tolerance to Pancreatic Glycoprotein 2 in Celiac Disease*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0128104.
621. Ma, L., et al., *Bmi-1 regulates autoreactive CD4+ T cell survival in immune thrombocytopenia patients*. J Clin Immunol, 2012. **32**(3): p. 505-13.
622. Dolganiuc, A., et al., *Type III interferons, IL-28 and IL-29, are increased in chronic HCV infection and induce myeloid dendritic cell-mediated FoxP3+ regulatory T cells*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e44915.
623. Podesta, M.A., D. Cucchiari, and C. Ponticelli, *The diverging roles of dendritic cells in kidney allotransplantation*. Transplant Rev (Orlando), 2015.
624. Adeegbe, D.O. and H. Nishikawa, *Natural and induced T regulatory cells in cancer*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 190.
625. Hackstein, H. and A.W. Thomson, *Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 24-34.
626. Pallotta, M.T., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(9): p. 870-8.
627. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
628. Lampropoulou, V., et al., *Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity*. Immunol Rev, 2010. **233**(1): p. 146-61.
629. Katz, D.H., et al., *Hapten-specific IgE antibody responses in mice. IV. Evidence for distinctive sensitivities of IgE and IgG B lymphocytes to the regulatory influence of T cells*. J Immunol, 1974. **113**(3): p. 974-83.
630. Zhang, Y., N. Gallastegui Crestani, and J.D. Rosenblatt, *Regulatory B cells in anti-tumor immunity*. Int Immunol, 2015.
631. Rosser, E.C. and C. Mauri, *Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function*. Immunity, 2015. **42**(4): p. 607-612.
632. Wang, Z., et al., *Lipid mediator lipoxin A4 inhibits tumor growth by targeting IL-10-producing regulatory B (Breg) cells*. Cancer Lett, 2015. **364**(2): p. 118-24.
633. Redfield, R.R., 3rd, et al., *Essential role for B cells in transplantation tolerance*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(5): p. 685-91.
634. Fleming, B.D., et al., *The generation of macrophages with anti-inflammatory activity in the absence of STAT6 signaling*. J Leukoc Biol, 2015.
635. Haitz, K.A. and N. Anandasabapathy, *Docosahexaenoic Acid alleviates atopic dermatitis in mice by generating T regulatory cells and m2 macrophages*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(6): p. 1472-4.

636. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
637. Gol-Ara, M., et al., *The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis, 2012. **2012**: p. 805875.
638. Kuniwa, Y., et al., *CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(23): p. 6947-58.
639. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 237-43.
640. Fowlkes, B.J., et al., *A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family*. Nature, 1987. **329**(6136): p. 251-4.
641. Tang, X.L., T.R. Smith, and V. Kumar, *Specific control of immunity by regulatory CD8 T cells*. Cell Mol Immunol, 2005. **2**(1): p. 11-9.
642. McEwen-Smith, R.M., M. Salio, and V. Cerundolo, *The Regulatory Role of Invariant NKT Cells in Tumor Immunity*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(5): p. 425-435.
643. Huber, S., D. Sartini, and M. Exley, *Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3147-53.
644. Godfrey, D.I., M.J. McConville, and D.G. Pellicci, *Chewing the fat on natural killer T cell development*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2229-32.
645. Godfrey, D.I. and S.P. Berzins, *Control points in NKT-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 505-18.
646. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
647. Alatrakchi, N., et al., *Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5882-92.
648. Amoroso, A., et al., *Evaluation of circulating CD4+CD25+ and liver-infiltrating Foxp3+ cells in HCV-associated liver disease*. Int J Mol Med, 2012. **29**(6): p. 983-8.
649. Zabransky, D.J., et al., *Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34547.
650. Gautron, A.S., et al., *Enhanced suppressor function of TIM-3+ FoxP3+ regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2014. **44**(9): p. 2703-11.
651. Povoleri, G.A., et al., *Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators?* Front Immunol, 2013. **4**: p. 169.
652. Geem, D., et al., *Harnessing regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(6): p. 1409-18.
653. Zeng, H., et al., *Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance*. Cell Mol Immunol, 2015.
654. Zhang, X., et al., *CD4(+)CD62L(+) central memory T cells can be converted to Foxp3(+) T cells*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77322.
655. Madireddi, S., et al., *SA-4-1BBL costimulation inhibits conversion of conventional CD4+ T cells into CD4+ FoxP3+ T regulatory cells by production of IFN-gamma*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42459.
656. Palomares, O., et al., *Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta*. Genes Immun, 2014. **15**(8): p. 511-20.
657. Cottrez, F. and H. Groux, *Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells*. Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): p. S12-5.
658. Bettini, M.L. and D.A. Vignali, *Development of thymically derived natural regulatory T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 1-12.
659. Dimova, T., et al., *Maternal Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy decidua: a phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples*. Am J Reprod Immunol, 2011. **66 Suppl 1**: p. 44-56.
660. Gregori, S., M. Battaglia, and M.G. Roncarolo, *Re-establishing immune tolerance in type 1 diabetes via regulatory T cells*. Novartis Found Symp, 2008. **292**: p. 174-83; discussion 183-6, 202-3.
661. Bacchetta, R., et al., *High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 493-502.
662. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
663. Bergmann, C., et al., *Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(9): p. 1429-42.
664. Fukura, H., Y. Komiya, and M. Igarashi, *Signaling pathway downstream of GABAA receptor in the growth cone*. J Neurochem, 1996. **67**(4): p. 1426-34.

665. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity*. J Clin Immunol, 2008. **28**(6): p. 647-59.
666. Rahimian, G., et al., *Virulence factors of Helicobacter pylori vacA increase markedly gastric mucosal TGF-beta1 mRNA expression in gastritis patients*. Microb Pathog, 2014. **67-68**: p. 1-7.
667. Sumitomo, S., et al., *Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF-beta1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2351-9.
668. Inobe, J., et al., *IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2780-90.
669. Jiang, Z., et al., *Hepatic stellate cells promote immunotolerance following orthotopic liver transplantation in rats via induction of T cell apoptosis and regulation of Th2/Th3-like cell cytokine production*. Exp Ther Med, 2013. **5**(1): p. 165-169.
670. Silva-Campa, E., et al., *Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Virology, 2009. **387**(2): p. 373-9.
671. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
672. Lan, R.Y., et al., *Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(6): p. 351-63.
673. Chaturvedi, V., et al., *Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6661-6.
674. Povoleri, G.A., et al., *Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators?* Front Immunol, 2013. **4**: p. 169.
675. Collison, L.W., et al., *The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional*. Nat Immunol, 2012. **13**(3): p. 290-9.
676. Olson, B.M., J.A. Sullivan, and W.J. Burlingham, *Interleukin 35: a key mediator of suppression and the propagation of infectious tolerance*. Front Immunol, 2013 **4**: p. 315.
677. Peterson, R.A., *Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression*. Toxicol Pathol, 2012. **40**(2): p. 186-204.
678. Lu, Y., et al., *iTreg induced from CD39 naive T cells demonstrate enhanced proliferate and suppressive ability*. Int Immunopharmacol, 2015.
679. Kaser, T., et al., *Natural and inducible Tregs in swine: Helios expression and functional properties*. Dev Comp Immunol, 2015. **49**(2): p. 323-31.
680. Shevach, E.M. and A.M. Thornton, *tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences*. Immunol Rev, 2014. **259**(1): p. 88-102.
681. Fisson, S., et al., *Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 737-46.
682. Campbell, D.J. and M.A. Koch, *Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 119-30.
683. Hori, S., *Stability of regulatory T-cell lineage*. Adv Immunol, 2011. **112**: p. 1-24.
684. Wang, H., et al., *[Relationship between CD4(+)CD25(High)CD127(low) regularly T cells in the peripheral blood and tumor regression after neoadjuvant therapy in patients with rectal cancer]*. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi. **18**(4): p. 361-4.
685. Caridade, M., L. Graca, and R.M. Ribeiro, *Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 378.
686. Whiteside, T.L., *Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2014. **14**(10): p. 1411-25.
687. Verhagen, J., A. Wegner, and D.C. Wraith, *Extra-thymically induced T regulatory cell subsets: the optimal target for antigen-specific immunotherapy*. Immunology, 2015. **145**(2): p. 171-81.
688. Iwasaki, Y., et al., *Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4+ T cells*. Eur J Immunol, 2013. **43**(4): p. 1063-73.
689. Neumann, C., et al., *Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers*. J Exp Med, 2014. **211**(9): p. 1807-19.
690. Fabien, S., et al., *CD49b, a major marker of regulatory T-cells type 1, predicts the response to antiviral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 290878.
691. Roncarolo, M.G., et al., *Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **380**: p. 39-68.
692. Gagliani, N., et al., *Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells*. Nat Med, 2013. **19**(6): p. 739-46.

693. Roncarolo, M.G. and S. Gregori, *Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells?* Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 925-7.
694. Passerini, L., et al., *Functional type 1 regulatory T cells develop regardless of FOXP3 mutations in patients with IPEX syndrome.* Eur J Immunol, 2011. **41**(4): p. 1120-31.
695. Mascanfroni, I.D., et al., *Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1-alpha.* Nat Med, 2015. **21**(6): p. 638-46.
696. Charbonnier, L.M., et al., *Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells.* J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3806-13.
697. Gregori, S., et al., *Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway.* Blood, 2010. **116**(6): p. 935-44.
698. Rahmoun, M., et al., *Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity.* Int Arch Allergy Immunol, 2006. **140**(2): p. 139-49.
699. Pletinckx, K., et al., *Immature dendritic cells convert anergic nonregulatory T cells into Foxp3- IL-10+ regulatory T cells by engaging CD28 and CTLA-4.* Eur J Immunol, 2015. **45**(2): p. 480-91.
700. Fujio, K., T. Okamura, and K. Yamamoto, *The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells.* Adv Immunol, 2010. **105**: p. 99-130.
701. Amodio, G., et al., *HLA-G expression levels influence the tolerogenic activity of human DC-10.* Haematologica, 2015. **100**(4): p. 548-57.
702. Bacchetta, R., et al., *Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines.* Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2237-45.
703. Marshall, D., et al., *Differential requirement for IL-2 and IL-15 during bifurcated development of thymic regulatory T cells.* J Immunol, 2014. **193**(11): p. 5525-33.
704. Magnani, C.F., et al., *Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells.* Eur J Immunol, 2011. **41**(6): p. 1652-62.
705. Dieckmann, D., et al., *Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected].* J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 247-53.
706. Battaglia, M. and M.G. Roncarolo, *Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells.* Inflamm Allergy Drug Targets, 2006. **5**(3): p. 157-65.
707. Annacker, O., et al., *CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10.* J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3008-18.
708. Golshayan, D., *All regulators great and small: when Treg need small RNAs to fulfill their commitment.* Transpl Int, 2015.
709. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance.* Immunol Rev, 2001. **182**: p. 18-32.
710. Jin, X., et al., *Large-scale in vitro expansion of human regulatory T cells with potent xenoantigen-specific suppression.* Cytotechnology, 2015.
711. Scully, R., et al., *Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells.* Eur J Immunol, 1994. **24**(10): p. 2383-92.
712. Seddon, B. and D. Mason, *Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity.* J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 877-82.
713. Hori, Y., et al., *Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16105-10.
714. Hsieh, C.S., et al., *Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors.* Immunity, 2004. **21**(2): p. 267-77.
715. Bystry, R.S., et al., *B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4.* Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1126-32.
716. Shen, Y., et al., *TGF-beta regulates hepatocellular carcinoma progression by inducing Treg cell polarization.* Cell Physiol Biochem, 2015. **35**(4): p. 1623-32.
717. Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka, *Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer.* J Exp Med, 1982. **156**(6): p. 1565-76.
718. Powrie, F. and D. Mason, *Subsets of rat CD4+ T cells defined by their differential expression of variants of the CD45 antigen: developmental relationships and in vitro and in vivo functions.* Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **159**: p. 79-96.
719. Ten Hove, T., et al., *Expression of CD45RB functionally distinguishes intestinal T lymphocytes in inflammatory bowel disease.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 1010-5.
720. Kuniyasu, Y., et al., *Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation.* Int Immunol, 2000. **12**(8): p. 1145-55.

721. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
722. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
723. La, X., et al., *Upregulation of PD-1 on CD4(+)CD25(+)T cells is associated with immunosuppression in liver of mice infected with Echinococcus multilocularis*. Int Immunopharmacol, 2015. **26**(2): p. 357-66.
724. Burchill, M.A., et al., *IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 280-90.
725. Zheng, L., et al., *A novel role of IL-2 in organ-specific autoimmune inflammation beyond regulatory T cell checkpoint: both IL-2 knockout and Fas mutation prolong lifespan of Scurfy mice but by different mechanisms*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8035-41.
726. Hori, S., *Stability of regulatory T-cell lineage*. Adv Immunol, 2011. **112**: p. 1-24.
727. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
728. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 329-41.
729. Hadaschik, E.N., et al., *Regulatory T cell-deficient scurfy mice develop systemic autoimmune features resembling lupus-like disease*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 35.
730. Duclaux-Loras, R., et al., *Long-term disease course in a patient with severe neonatal IPEX syndrome*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015.
731. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
732. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
733. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5126-31.
734. Hori, S. and S. Sakaguchi, *Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells*. Microbes Infect, 2004. **6**(8): p. 745-51.
735. Lahl, K., et al., *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 57-63.
736. Gavin, M.A., et al., *Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6659-64.
737. Sayed, D., et al., *Is Foxp3 a good marker for regulatory T cells?* Egypt J Immunol, 2014. **21**(2): p. 1-8.
738. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 766-70.
739. Golshayan, D., et al., *In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance*. Blood, 2007. **109**(2): p. 827-35.
740. Hougardy, J.M., et al., *In vitro expansion of CD4+CD25highFOXP3+CD127low/- regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy Mycobacterium tuberculosis-infected humans*. Microbes Infect, 2007. **9**(11): p. 1325-32.
741. Ndhlovu, L.C., et al., *FOXP3 expressing CD127lo CD4+ T cells inversely correlate with CD38+ CD8+ T cell activation levels in primary HIV-1 infection*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(2): p. 254-62.
742. Perna, S.K., et al., *Interleukin-7 mediates selective expansion of tumor-redirected cytotoxic T lymphocytes (CTLs) without enhancement of regulatory T-cell inhibition*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(1): p. 131-9.
743. Shatry, A., et al., *Targeting Treg cells in situ: emerging expansion strategies for (CD4+)CD25(+) regulatory T cells*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(10): p. 1239-43.
744. Seddiki, N., et al., *Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2830-8.
745. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
746. Ohta, A., et al., *A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13132-7.
747. Klein, S., et al., *CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 492-9.
748. Fu, S., et al., *CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential*. Am J Transplant, 2004. **4**(1): p. 65-78.
749. Ma, Y.H., et al., *Vitamin D deficiency contributes to the reduction and impaired function of naive CD45RA(+) regulatory T cell in chronic heart failure*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 547697.

750. Barthlott, T., et al., *A subpopulation of CD103(pos) ICOS(pos) Treg cells occurs at high frequency in lymphopenic mice and represents a lymph node specific differentiation stage.* Eur J Immunol, 2015. **45**(6): p. 1760-71.
751. Yan, L., et al., *Abnormal quantity and function of regulatory T cells in peripheral blood of patients with severe aplastic anemia.* Cell Immunol, 2015.
752. Webster, W.S., et al., *Targeting molecular and cellular inhibitory mechanisms for improvement of antitumor memory responses reactivated by tumor cell vaccine.* J Immunol, 2007. **179**(5): p. 2860-9.
753. Camisaschi, C., et al., *LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites.* J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6545-51.
754. Koch, M.A., et al., *The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation.* Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 595-602.
755. Chaudhry, A., et al., *CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner.* Science, 2009. **326**(5955): p. 986-91.
756. Zheng, Y., et al., *Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses.* Nature, 2009. **458**(7236): p. 351-6.
757. Wang, J., et al., *Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4036-45.
758. Joedicke, J.J., et al., *Activated CD8+ T cells induce expansion of Vbeta5+ regulatory T cells via TNFR2 signaling.* J Immunol, 2014. **193**(6): p. 2952-60.
759. Dong, J.C., et al., *Role of PLC-PIP2 and cAMP-PKA signal pathways in radiation-induced immune-suppressing effect.* Biomed Environ Sci, 2014. **27**(1): p. 27-34.
760. Seyerl, M., et al., *Human rhinoviruses induce IL-35-producing Treg via induction of B7-H1 (CD274) and sialoadhesin (CD169) on DC.* Eur J Immunol, 2010. **40**(2): p. 321-9.
761. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression.* Trends Mol Med, 2007. **13**(3): p. 108-16.
762. Penalzoza, H.F., et al., *Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by Streptococcus pneumoniae.* Immunology, 2015.
763. Uhlig, H.H., et al., *The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2014. **147**(5): p. 990-1007 e3.
764. Franz, M., et al., *Targeted delivery of interleukin-10 to chronic cardiac allograft rejection using a human antibody specific to the extra domain A of fibronectin.* Int J Cardiol, 2015. **195**: p. 311-322.
765. Engelhardt, K.R., et al., *Clinical outcome in IL-10- and IL-10 receptor-deficient patients with or without hematopoietic stem cell transplantation.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(3): p. 825-30.
766. Lal, G., et al., *Interleukin-10 From Marginal Zone Precursor B-Cell Subset Is Required for Costimulatory Blockade-Induced Transplantation Tolerance.* Transplantation, 2015.
767. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
768. Cirone, M., et al., *Suppression of dendritic cell differentiation through cytokines released by Primary Effusion Lymphoma cells.* Immunol Lett, 2008. **120**(1-2): p. 37-41.
769. Jung, W.Y., et al., *Human adipose-derived stem cells attenuate inflammatory bowel disease in IL-10 knockout mice.* Tissue Cell, 2015. **47**(1): p. 86-93.
770. Uhlig, H.H., et al., *Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis.* J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5852-60.
771. Sun, L., S. Yi, and P.J. O'Connell, *IL-10 is required for human CD4(+)CD25(+) regulatory T cell-mediated suppression of xenogeneic proliferation.* Immunol Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 477-85.
772. Feng, X., et al., *Increased frequency of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. **59**(4): p. 309-14.
773. Matiller, V., et al., *Altered expression of transforming growth factor-beta isoforms in bovine cystic ovarian disease.* Reprod Domest Anim, 2014. **49**(5): p. 813-23.
774. Gao, J., et al., *TGF-beta isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells.* Cancer Cell Int, 2014. **14**(1): p. 72.
775. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease.* Nature, 1992. **359**(6397): p. 693-9.
776. Worthington, J.J., et al., *Integrin alphavbeta8-Mediated TGF-beta Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation.* Immunity, 2015. **42**(5): p. 903-15.
777. Anderson, C.F., et al., *IL-10 and TGF-beta control the establishment of persistent and transmissible infections produced by Leishmania tropica in C57BL/6 mice.* J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4090-7.
778. Han, Y., et al., *Human hepatocellular carcinoma-infiltrating CD4(+)CD69(+)Foxp3(-) regulatory T cell suppresses T cell response via membrane-bound TGF-beta1.* J Mol Med (Berl), 2014**92**(5): p. 539-50.

779. Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms*. *Immunity*, 2006. **25**(3): p. 455-71.
780. Fahlen, L., et al., *T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2005. **201**(5): p. 737-46.
781. Diener, K.R., et al., *Transforming growth factor-beta-mediated signaling in T lymphocytes impacts on prostate-specific immunity and early prostate tumor progression*. *Lab Invest*, 2009. **89**(2): p. 142-51.
782. Gil-Guerrero, L., et al., *In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1*. *J Immunol*, 2008. **181**(1): p. 126-35.
783. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. *J Exp Med*, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
784. Zhou, Y., et al., *The roles of T helper type 17/regulatory T cells in acute rejection after liver transplantation in rats*. *Transplantation*, 2015. **99**(6): p. 1126-31.
785. Wei, H.X., et al., *CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice*. *J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 7221-9.
786. Niedbala, W., et al., *IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(11): p. 3021-9.
787. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. *Nature*, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
788. Collison, L.W., et al., *Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner*. *J Immunol*, 2009. **182**(10): p. 6121-8.
789. Bardel, E., et al., *Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35*. *J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 6898-905.
790. Castellani, M.L., et al., *IL-35, an anti-inflammatory cytokine which expands CD4+CD25+ Treg Cells*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2010. **24**(2): p. 131-5.
791. Yue, C.Y., B. Zhang, and C.M. Ying, *Elevated Serum Level of IL-35 Associated with the Maintenance of Maternal-Fetal Immune Tolerance in Normal Pregnancy*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0128219.
792. Shevach, E.M. and A.M. Thornton, *tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences*. *Immunol Rev*, 2014. **259**(1): p. 88-102.
793. Tran, D.Q., et al., *Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function*. *J Immunol*, 2009. **182**(5): p. 2929-38.
794. Havari, E., et al., *Impact of alemtuzumab treatment on the survival and function of human regulatory T cells in vitro*. *Immunology*, 2014**141**(1): p. 123-31.
795. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
796. Almahariq, M., et al., *Exchange protein directly activated by cAMP modulates regulatory T-cell-mediated immunosuppression*. *Biochem J*, 2015. **465**(2): p. 295-303.
797. Vang, A.G., et al., *Regulatory T-cells and cAMP suppress effector T-cells independently of PKA-CREM/ICER: a potential role for Epac*. *Biochem J*, 2013**456**(3): p. 463-73.
798. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. *J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
799. Jenabian, M.A., et al., *Regulatory T cells negatively affect IL-2 production of effector T cells through CD39/adenosine pathway in HIV infection*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(4): p. e1003319.
800. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
801. Deaglio, S., et al., *CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential*. *Blood*, 2007. **110**(12): p. 4012-21.
802. Sitkovsky, M.V. and A. Ohta, *The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?* *Trends Immunol*, 2005. **26**(6): p. 299-304.
803. Sitkovsky, M.V., *T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(3): p. 102-8.
804. Sitkovsky, M.V., et al., *Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(19): p. 5947-52.
805. Costa, P.A., et al., *Induction of inhibitory receptors on T cells during Plasmodium vivax malaria impairs cytokine production*. *J Infect Dis*, 2015.
806. Romano, E., et al., *Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(19): p. 6140-5.

807. Ronchetti, S., et al., *Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 171520.
808. Riccardi, C., M.G. Cifone, and G. Migliorati, *Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GITR and GILZ, two dexamethasone-induced genes*. Cell Death Differ, 1999. **6**(12): p. 1182-9.
809. Wilczynski, J.R., M. Radwan, and J. Kalinka, *The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2266-74.
810. Ronchetti, S., et al., *GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 613-22.
811. Fujio, K., et al., *[The functions of CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells and Egr2 in the regulation of autoimmunity]*. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2014. **37**(2): p. 69-73.
812. Chu, K.H. and B.L. Chiang, *Characterization and functional studies of forkhead box protein 3(-) lymphocyte activation gene 3(+) CD4(+) regulatory T cells induced by mucosal B cells*. Clin Exp Immunol, 2015. **180**(2): p. 316-28.
813. Morales, O., et al., *Epstein-Barr virus infection induces an increase of T regulatory type 1 cells in Hodgkin lymphoma patients*. Br J Haematol, 2014**166**(6): p. 875-90.
814. Okamura, T., et al., *CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13974-9.
815. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5916-26.
816. Huang, Y.J., et al., *Induced and thymus-derived Foxp3(+) regulatory T cells share a common niche*. Eur J Immunol, 2014. **44**(2): p. 460-8.
817. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 402-13.
818. Glinka, Y. and G.J. Prud'homme, *Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(1): p. 302-10.
819. Choi, Y.S., et al., *Liver injury in acute hepatitis A is associated with decreased frequency of regulatory T cells caused by Fas-mediated apoptosis*. Gut, 2014.
820. Velaga, S., et al., *Granzyme A Is Required for Regulatory T-Cell Mediated Prevention of Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124927.
821. Boissonnas, A., et al., *Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes*. Immunity, 2010. **32**(2): p. 266-78.
822. Ataera, H., et al., *The control of CD8+ T cell responses is preserved in perforin-deficient mice and released by depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(4): p. 825-33.
823. Kared, H., et al., *Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003422.
824. Diao, Z., et al., *TRAIL suppresses tumor growth in mice by inducing tumor-infiltrating CD4(+)CD25 (+) Treg apoptosis*. Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(4): p. 653-63.
825. Kho, S., et al., *Preserved dendritic cell HLA-DR expression and reduced regulatory T cell activation in asymptomatic Plasmodium falciparum and P. vivax infection*. Infect Immun, 2015.
826. Xie, F.T., et al., *IDO expressing dendritic cells suppress allograft rejection of small bowel transplantation in mice by expansion of Foxp3 regulatory T cells*. Transpl Immunol, 2015.
827. Alijotas-Reig, J., E. Llorba, and J.M. Gris, *Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells*. Placenta, 2014. **35**(4): p. 241-8.
828. Jiang, S., D. Peng, and L. He, *[Progress in regulatory T cells and hepatocellular carcinoma]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2015. **40**(4): p. 433-7.
829. Aluvihare, V.R., M. Kallikourdis, and A.G. Betz, *Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 266-71.
830. Alijotas-Reig, J., T. Melnychuk, and J.M. Gris, *Regulatory T cells, maternal-foetal immune tolerance and recurrent miscarriage: new therapeutic challenging opportunities*. Med Clin (Barc), 2015. **144**(6): p. 265-8.
831. Lin, Y., et al., *Prevention of CpG-induced pregnancy disruption by adoptive transfer of in vitro-induced regulatory T cells*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94702.
832. Zenclussen, M.L., et al., *The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(3): p. 200-8.
833. Loewendorf, A.I., et al., *Preeclampsia is Characterized by Fetal NK Cell Activation and a Reduction in Regulatory T Cells*. Am J Reprod Immunol, 2015.
834. van der Net, J.B., et al., *Regulatory T cells: first steps of clinical application in solid organ transplantation*. Transpl Int, 2015.

835. Soltaninejad, E., et al., *Differential expression of microRNAs in renal transplant patients with acute T-cell mediated rejection*. *Transpl Immunol*, 2015.
836. Kaul, A.M., et al., *Acute and chronic rejection: compartmentalization and kinetics of counterbalancing signals in cardiac transplants*. *Am J Transplant*, 2015. **15**(2): p. 333-45.
837. Hanajiri, R., et al., *Integration of humoral and cellular HLA-specific immune responses in cord blood allograft rejection*. *Bone Marrow Transplant*, 2015
838. Kim, K.W., et al., *The effect of mammalian target of rapamycin inhibition on T helper type 17 and regulatory T cell differentiation in vitro and in vivo in kidney transplant recipients*. *Immunology*, 2015 **144**(1): p. 68-78.
839. Miroux, C., et al., *Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil*. *Transplant Proc*, 2012. **44**(9): p. 2834-9.
840. Scalea, J.R., et al., *Abrogation of renal allograft tolerance in MGH miniature swine: the role of intra-graft and peripheral factors in long-term tolerance*. *Am J Transplant*, 2014. **14**(9): p. 2001-10.
841. Martinez-Llordella, M., et al., *Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation*. *Am J Transplant*, 2007. **7**(2): p. 309-19.
842. Moore, C., et al., *Alloreactive regulatory T cells generated with retinoic acid prevent skin allograft rejection*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(2): p. 452-63.
843. Pacheco-Gonzalez, R.M., et al., *Analysis of FOXP3 gene in children with allergy and autoimmune diseases*. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2015.
844. Vasiljevic, A., et al., *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome and recurrent intrauterine fetal death*. *Lancet*, 2015. **385**(9982): p. 2120.
845. He, Y., et al., *[Effects of altered IFNAR expression on CD4+ CD25+ treg cell dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus]*. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2015. **46**(2): p. 209-13.
846. Alunno, A., et al., *Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory th17 cells and therapeutic implications*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 751793.
847. Wang, L.H., et al., *Insufficient increment of CD4+CD25+ regulatory T cells after stimulation in vitro with allergen in allergic asthma*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009. **148**(3): p. 199-210.
848. Shen, Y., et al., *Allergen induced Treg response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with nasal polyposis*. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2014. **32**(4): p. 300-7.
849. Johannesson, B., et al., *Insulin-like growth factor-1 induces regulatory T cell-mediated suppression of allergic contact dermatitis in mice*. *Dis Model Mech*, 2014. **7**(8): p. 977-85.
850. Wolf, D., et al., *Treg(s) in Cancer: Friends or Foe?* *J Cell Physiol*, 2015.
851. Shen, X., et al., *Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage of hepatocellular carcinoma*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010. **136**(11): p. 1745-54.
852. Akeus, P., et al., *Treg-cell depletion promotes chemokine production and accumulation of CXCR3(+) conventional T cells in intestinal tumors*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(6): p. 1654-66.
853. Facciabene, A., G.T. Motz, and G. Coukos, *T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis*. *Cancer Res*, 2012. **72**(9): p. 2162-71.
854. Ormandy, L.A., et al., *Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2457-64.
855. Wang, S.Y., et al., *[Increase in peripheral and liver infiltrating regulatory T cells favors development of primary hepatocellular carcinoma]*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2011. **27**(6): p. 668-70.
856. Whiteside, T.L., *Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression?* *Cancer Immunol Immunother*, 2014. **63**(1): p. 67-72.
857. Hashimoto, H., et al., *Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors*. *Cancer Gene Ther*, 2014. **21**(12): p. 532-41.
858. Lee, I.C., et al., *Serum interferon gamma level predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients after curative treatments*. *Int J Cancer*, 2013. **133**(12): p. 2895-902.
859. de Aquino, M.T., et al., *Role of CD25(+) CD4(+) T cells in acute and persistent coronavirus infection of the central nervous system*. *Virology*, 2013. **447**(1-2): p. 112-20.
860. Boer, M.C., S.A. Joosten, and T.H. Ottenhoff, *Regulatory T-Cells at the Interface between Human Host and Pathogens in Infectious Diseases and Vaccination*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 217.
861. Rowe, J.H., J.M. Ertelt, and S.S. Way, *Foxp3(+) regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection*. *Immunology*, 2012. **136**(1): p. 1-10.
862. Park, H.J., et al., *PD-1 Upregulated on Regulatory T Cells during Chronic Virus Infection Enhances the Suppression of CD8+ T Cell Immune Response via the Interaction with PD-L1 Expressed on CD8+ T Cells*. *J Immunol*, 2015. **194**(12): p. 5801-11.

863. Lund, J.M., et al., *Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells*. Science, 2008. **320**(5880): p. 1220-4.
864. Ouaguia, L., et al., *Control of the inflammatory response mechanisms mediated by natural and induced regulatory T-cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-associated cancers*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 564296.
865. Amoroso, A., et al., *Evaluation of circulating CD4+CD25+ and liver-infiltrating Foxp3+ cells in HCV-associated liver disease*. Int J Mol Med, 2012 **29**(6): p. 983-8.
866. Cabrera, R., et al., *An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1062-71.
867. Sugimoto, K., et al., *Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection*. Hepatology, 2003. **38**(6): p. 1437-48.
868. Smyk-Pearson, S., et al., *Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection*. J Infect Dis, 2008. **197**(1): p. 46-57.
869. Ward, S.M., et al., *Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection*. J Hepatol, 2007. **47**(3): p. 316-24.
870. Itose, I., et al., *Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis*. J Viral Hepat, 2009. **16**(12): p. 844-52.
871. Bolacchi, F., et al., *Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(2): p. 188-96.
872. Utsumi, M., et al., *Frequency of regulatory T-cell and hepatitis C viral antigen-specific immune response in recurrent hepatitis C after liver transplantation*. Transpl Immunol, 2014. **31**(1): p. 33-41.
873. Piconese, S., E. Timperi, and V. Barnaba, *'Hardcore' OX40 immunosuppressive regulatory T cells in hepatic cirrhosis and cancer*. Oncoimmunology, 2014. **3**: p. e29257.
874. Hall, C.H., et al., *HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12154.
875. Moorman, J.P., et al., *Tim-3 pathway controls regulatory and effector T cell balance during hepatitis C virus infection*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 755-66.
876. Ji, X.J., et al., *HCV-infected hepatocytes drive CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T-cell development through the Tim-3/Gal-9 pathway*. Eur J Immunol, 2013. **43**(2): p. 458-67.
877. Cusick, M.F., et al., *Hepatitis C virus induces regulatory T cells by naturally occurring viral variants to suppress T cell responses*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 806061.
878. Zhai, N., et al., *Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4CD25 regulatory T cells in chronic hepatitis C patients*. Cell Mol Immunol, 2014.
879. Ebinuma, H., et al., *Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection*. J Virol, 2008. **82**(10): p. 5043-53.
880. Li, S., et al., *Defining target antigens for CD25+ FOXP3 + IFN-gamma- regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(3): p. 197-204.
881. MacDonald, A.J., et al., *CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons*. J Infect Dis, 2002. **185**(6): p. 720-7.
882. Langhans, B., et al., *Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C*. Clin Sci (Lond), 2010. **119**(2): p. 97-109.
883. Mishiro, S., et al., *An autoantibody cross-reactive to hepatitis C virus core and a host nuclear antigen*. Autoimmunity, 1991. **10**(4): p. 269-73.
884. Losikoff, P.T., et al., *HCV epitope, homologous to multiple human protein sequences, induces a regulatory T cell response in infected patients*. J Hepatol, 2015. **62**(1): p. 48-55.
885. Tiegs, G. and A.W. Lohse, *Immune tolerance: what is unique about the liver*. J Autoimmun, 2010. **34**(1): p. 1-6.
886. Bamboat, Z.M., et al., *Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 1901-11.
887. O'Beirne, J., et al., *Inhibition of major histocompatibility complex Class I antigen presentation by hepatitis C virus core protein in myeloid dendritic cells*. Virology, 2009. **389**(1-2): p. 1-7.
888. Waggoner, S.N., C.H. Hall, and Y.S. Hahn, *HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(6): p. 1407-19.
889. Yoshizawa, K., et al., *Expansion of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2010. **40**(2): p. 179-87.
890. Dominguez-Villar, M., et al., *Up-regulation of FOXP3 and induction of suppressive function in CD4+ Jurkat T-cells expressing hepatitis C virus core protein*. Clin Sci (Lond), 2012. **123**(1): p. 15-27.

891. Ni, J., et al., *Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3429-39.
892. Leroy, V., et al., *Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. **38**(4): p. 829-41.
893. Fabien, S., et al., *CD49b, a major marker of regulatory T-cells type 1, predicts the response to antiviral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation*. Biomed Res Int, 2013. **2014**: p. 290878.
894. Wang, J.H., et al., *Characterization of antigenic variants of hepatitis C virus in immune evasion*. Virol J, 2011**8**: p. 377.
895. Soliman, G.M., et al., *The role of plasma transforming growth factor beta-1 in the development of fibrosis in patient with HCV related steatohepatitis*. J Egypt Soc Parasitol, 2010. **40**(3): p. 759-72.
896. Serti, E., et al., *Modulation of IL-2 expression after uptake of hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles: the role of p38 kinase*. Cell Mol Life Sci, 2012. **68**(3): p. 505-22.
897. Vocanson, M., et al., *Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(2): p. 280-9, 289 e1-7.
898. Kallies, A., et al., *A role for Blimp1 in the transcriptional network controlling natural killer cell maturation*. Blood, 2011. **117**(6): p. 1869-79.
899. Zhang, J.P., et al., *Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients*. J Hepatol, 2009. **50**(5): p. 980-9.
900. Kondo, Y., et al., *HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98521.
901. Balanescu, P., et al., *Th17 and IL-17 immunity in chronic hepatitis C infection*. Rom J Intern Med, 2014. **50**(1): p. 13-8.
902. Voo, K.S., et al., *Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4793-8.
903. Hao, C., et al., *Imbalance of regulatory T cells and T helper type 17 cells in patients with chronic hepatitis C*. Immunology, 2014. **143**(4): p. 531-8.
904. Beriou, G., et al., *IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function*. Blood, 2009. **113**(18): p. 4240-9.
905. Ouaguia, L., et al., *Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma*. ISRN Hepatology, 2013. **2013**: p. 564296.
906. Li, Q., et al., *Inhibiting effect of Astragalus polysaccharides on the functions of CD4+CD25 highTreg cells in the tumor microenvironment of human hepatocellular carcinoma*. Chin Med J (Engl), 2012. **125**(5): p. 786-93.
907. Miroux, C., T. Vausselin, and N. Delhem, *Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response*. Expert Opin Biol Ther, 2010. **10**(11): p. 1563-72.
908. Fahey, S., E. Dempsey, and A. Long, *The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection*. Cell Mol Immunol, 2014. **11**(1): p. 25-40.
909. Heydtmann, M. and D.H. Adams, *Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection*. Hepatology, 2009. **49**(2): p. 676-88.
910. Wu, X., et al., *T cell-extrinsic CD18 attenuates antigen-dependent CD4+ T cell activation in vivo*. J Immunol, 2015. **194**(9): p. 4122-9.
911. Levine, B.L., et al., *Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 5921-30.
912. Vasanthakumar, A. and A. Kallies, *IL-27 paves different roads to Tr1*. Eur J Immunol, 2013. **43**(4): p. 882-5.
913. Fedoseeva, N.V., et al., *[Features of proliferative response of T-cells on hepatitis c virus antigens in healthy individuals contacting with this virus]*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2013(3): p. 38-44.
914. Fernandez-Ponce, C., et al., *CD4+ primary T cells expressing HCV-core protein upregulate Foxp3 and IL-10, suppressing CD4 and CD8 T cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85191.
915. Strauss, L., C. Bergmann, and T.L. Whiteside, *Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1469-80.
916. Skapenko, A., et al., *The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 6107-16.
917. Kakumu, S., et al., *Localisation of intrahepatic interleukin 6 in patients with acute and chronic liver disease*. J Clin Pathol, 1992. **45**(5): p. 408-11.
918. Lemmers, A., et al., *The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease*. Hepatology, 2009. **49**(2): p. 646-57.
919. Pawlotsky, J.M., et al., *From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure*. J Hepatol, 2015. **62**(15): p. S87-S99.

920. Coilly, A., et al., *Management of post transplant hepatitis C in the direct antiviral agents era*. Hepatol Int, 2015. **9**(2): p. 192-201.
921. Groux, H. and F. Powrie, *Regulatory T cells and inflammatory bowel disease*. Immunol Today, 1999. **20**(10): p. 442-5.
922. Suvas, S., et al., *CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 889-901.
923. Dittmer, U., et al., *Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 293-303.
924. Losikoff, P.T., A.A. Self, and S.H. Gregory, *Dendritic cells, regulatory T cells and the pathogenesis of chronic hepatitis C*. Virulence, 2012. **3**(7): p. 610-20.
925. Oo, Y.H., et al., *Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 2886-98.
926. Veiga-Parga, T., S. Sehrawat, and B.T. Rouse, *Role of regulatory T cells during virus infection*. Immunol Rev, 2013. **255**(1): p. 182-96.
927. Sehrawat, S., et al., *In vitro-generated antigen-specific CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells control the severity of herpes simplex virus-induced ocular immunoinflammatory lesions*. J Virol, 2008. **82**(14): p. 6838-51.
928. Tang, Q., et al., *In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes*. J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1455-65.
929. Sarkar, D., et al., *Expanded Autologous Polyclonal Regulatory T Cells Suppress Inhibitor Formation in Hemophilia*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2014. **1**.
930. Shin, H. and A. Iwasaki, *A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 463-7.
931. Mitsui, J., et al., *Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(10): p. 2781-91.
932. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
933. Mengshol, J.A., et al., *A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9504.
934. Oomizu, S., et al., *Cell surface galectin-9 expressing Th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by galectin-9 secretion*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48574.

ANNEXES

ARTICLE 4

Contrairement au Mycophenolate Mofetil, les corticostéroïdes ne reversent pas l'effet inhibiteur de la cyclosporine sur l'activité des lymphocytes T régulateurs

Corticosteroids Do Not Reverse the Inhibitory Effect of Cyclosporine on Regulatory T-Cell Activity in Contrast to Mycophenolate Mofetil

Transplantation Proceedings, 44, 2834–2839 (2012)

Celine Miroux, Olivier Morales, **Laurissa Ouaguia**, Lynda Aoudjehane, Emmanuel Boleslawski, Véronique Pancré, Yvan de Launoit, Yvon. Calmus, Filomena Conti et Nadira Delhem

Mots clés : Treg, Cyclosporine A, Mycophenolate Mofetil, Immune suppression

Résumé : la transplantation hépatique orthotopique (OLT) est le traitement de choix pour les stades très avancés des maladies chroniques du foie. La réinfection virale du greffon après transplantation hépatique pour cause virale C est quasi universelle chez les patients même si, de nos jours, le taux de survie à long terme des patients est très élevé. Les traitements d'immunosuppression conventionnels, utilisés pour favoriser la tolérance des greffons sont la cyclosporine A (CsA), le tacrolimus (Tac), le mycophenolate mofetil (MMF) et les corticostéroïdes. La survie du foie transplanté peut également être favorisée par l'immunosuppression médiée par les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ (Treg). A cet effet, les Treg sont essentiels pour l'induction et l'entretien de l'auto-tolérance immunologique ainsi que pour la tolérance en transplantation. Des études antérieures de l'équipe ont décrit que des faibles doses de CsA pouvaient inhiber l'activité des Treg par induction de l'interleukine-2 et de l'interféron- γ . Dans cette étude, nous avons étudié, sur les lymphocytes T CD4+CD25+ humains, l'effet des autres immunosuppresseurs MMF et des corticoïdes, qui sont le plus souvent utilisés en combinaison avec un inhibiteur de la calcineurine dont la CsA.

Matériels et méthodes : Les cellules CD4+CD25+ (Treg) sont isolées à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains puis cultivées *in vitro* avec de la CsA en présence ou en l'absence de corticoïdes ou MMF. Le phénotype des cellules isolées a été évalué par cytométrie en flux et l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs a été évaluée par des expériences de suppression (MLR) incluant la co-culture de CD4+CD25+ avec les PBMC activées autologues.

Résultats et discussion : les résultats montrent que les Treg isolés possèdent bien le phénotype CD4+CD25+CD127-FOXP3+ avec une pureté supérieur à 95%. De plus, l'analyse fonctionnelle de ces Treg montre qu'ils sont totalement anergiques *in vitro*. Les expériences effectuées révèlent que la prolifération des Treg peut être inhibée par l'ajout de CsA et le MMF, et ce de façon dose-dépendante. Afin de confirmer que nous avons isolé des Treg bien fonctionnels, nous avons évalué la capacité suppressive des cellules isolées. Nos résultats ont montré que les Treg isolés inhibaient significativement la prolifération des PBMC autologues. Des analyses approfondies ont montré que l'ajout de faibles concentrations de CsA réduisait la capacité suppressive des Treg naturels tandis que l'ajout de forte concentration de CsA ne semblait pas avoir d'impact sur leur fonction régulatrice.

Les corticostéroïdes sont connus pour augmenter la fréquence des lymphocytes T régulateurs ainsi que l'expression des marqueurs CD25 et FOXP3. Ainsi, nous avons regardé si certains corticostéroïdes pouvaient reverser les effets inhibiteurs des faibles concentrations

de CsA sur les Treg humains. Nos résultats ont confirmé que l'ajout de corticostéroïdes augmentait l'expression *in vitro* du CD25. Cependant, cet ajout ne modifiait absolument pas les effets inhibiteurs de la CsA sur l'activité suppressive des Treg.

On sait également que le MMF peut inhiber les effets des traitements anti-calcineurines sur les Treg, favorisant le maintien de leur activité suppressive *in vitro*. Or, en thérapie post-TH, la CsA toujours utilisée en association avec le MMF. Ainsi, nous avons évalué l'impact du MMF sur les effets inhibiteurs des concentrations thérapeutiques de CsA sur l'activité des Treg *in vitro*. Contrairement au Dexaméthazone, l'ajout de MMF reverse l'effet inhibiteur des faibles doses de CsA sur l'activité des Treg.

Conclusion : Nos études précédentes avaient montré que la cyclosporine A pouvait sensiblement diminuer la fonction des lymphocytes T régulateurs humains CD4+CD25+. Dans cette étude, nous rapportons que l'utilisation des corticoïdes n'est pas en mesure de reverser cet effet, alors que l'utilisation du mycophenolate mofetil le peut, suggérant ainsi que la combinaison MMF/CsA promeut le maintien de l'activité des lymphocytes T régulateurs, ce qui favoriserait la tolérance des greffons après transplantation hépatique.

Corticosteroids Do Not Reverse the Inhibitory Effect of Cyclosporine on Regulatory T-Cell Activity in Contrast to Mycophenolate Mofetil

C. Miroux, O. Morales, L. Ouaguia, L. Aoudjehane, E. Boleslawski, V. Pancré, Y. de Launoit, Y. Calmus, F. Conti, and N. Delhem

ABSTRACT

Background. Inevitable hepatitis C virus recurrence after liver transplantation, a major barrier to survival of the transplanted liver may be promoted by immunosuppression and by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg). Treg cells are essential for the induction and maintenance of immunologic self-tolerance as well as transplant tolerance. Moreover, we have previously described low doses of cyclosporine (CsA) to inhibit Treg activity by inducing interleukin-2 and interferon- γ . We investigated here in, the effect of mycophenolate mofetil (MMF) and corticosteroids, usually used in combination with a calcineurin inhibitor on human CD4⁺CD25⁺ Treg cells.

Methods. Human CD4⁺CD25⁺ cells isolated from healthy donors were cultured in the presence of CsA +/- corticoids or MMF. Suppressive activity of regulatory T cells was assessed in mixed leukocyte reactions including CD25⁺ solvents with autologous activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Results. MMF and dexamethasone inhibited PBMC and Treg proliferation in dose-dependent fashion, maintaining the suppressive activity of Treg cells. However, the association of corticoids with CsA could not reverse the inhibitory effects of CsA on Treg activity, unlike the MMF and CsA combination.

Conclusion. We have previously shown CsA to significantly impair the function of CD4⁺CD25⁺ Treg cells. Herein we reports that corticoids were not able to reverse this effect, whereas MMF counterbalanced it, suggesting that the combination of MMF with CsA maintains regulatory T cells activity promoting tolerance.

LIVER TRANSPLANTATION (OLT) is the treatment of choice for end-stage liver diseases; long-term survival rates are now excellent. Conventional immunosuppressive therapy employs a calcineurin inhibitor (CNI) such as cyclosporine (CsA) or tacrolimus (Tac), as well as mycophenolate mofetil (MMF) and corticosteroids to control immune responses.

Graft rejection may be influenced by regulatory T cells (Treg), which account for 5% to 10% of peripheral CD4⁺ T cells. These elements, which constitutively express CD25,¹ suppress host response in autoimmune diseases and transplantations^{2,3} they seem to be an essential component in immune tolerance.⁴ Treg are naturally anergic to in vitro antigenic stimulation a state that is closely linked to their suppressive activity.⁵ The interleukin (IL)-2-2-R pathway seems to be important for the activity and expansion of Treg.^{6,7}

Several experimental studies have demonstrated Treg to induce allograft tolerance.^{8,9} Their circulating levels fall significantly after OLT, especially during allograft rejection.

From the CNRS-UMR 8161-Institut de Biologie de Lille (C.M., D.M., L.O., E.B., V.P., Y.d.L., N.D.), Lille, France; UPMC Université Paris 06 & INSERM, UMR_S 938 (L.A., Y.C., F.C.), CdR Saint-Antoine, Paris, France; AP-HP, Hôpital Saint-Antoine (Y.C., F.C.), Pole Digestif, Centre de Transplantation Hépatique, Paris, France, and Faculté de Médecine René Descartes Université Paris 05 (Y.C., F.C.), Paris, France.

This work received support from the "Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites virales" (ANRS), from "Astellas France" and from the "Comité du Nord de la Ligue contre le cancer." F.C. and N.D. contributed equally to this work.

Address reprint requests to Nadira Delhem, PhD, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59020 Lille Cedex, France. E-mail: nadira.delhem@ibl.fr

tion,¹⁰ the reduction is counterbalanced by an increase in the graft.¹¹ Treg are influenced by immunosuppressive therapy; in particular, CNI seem to reduce Treg function in vitro.¹²

However, graft function and long-term survival can also be affected by recurrence of hepatitis C, the main indication for OLT. Indeed, hepatitis C virus (HCV) infection of the graft is universal; it accelerates graft damage, leading to cirrhosis in 20 to 30% of patients within 5 years,¹³ and reducing patient survival.^{14,15} The main factors determining the severity of recurrent hepatitis C seems to be immunosuppressive therapy¹⁶ and the proportion of Treg.¹⁷

Concerning immunosuppressive therapy, a recent randomized pilot study showed that a switch from Tac to CsA therapy displayed a beneficial effect on hepatitis C recurrence.¹⁸ In addition, an increased frequency of Treg compared with subjects who had cleared HCV was recently observed in the blood of patients with persistent HCV infections.^{19,20} Thus Treg may contribute to HCV persistence by suppressing HCV-specific T-cell responses.^{21,22} Treg levels have also been shown to be significantly augmented in recurrent hepatitis C; Treg type 1 cells are specifically increased in cases of severe recurrent hepatitis C,¹⁷ Patients experiencing suggesting that Treg may be implicated in the pathogenesis of HCV recurrence.

Therefore, Treg may play a beneficial role in tolerance induction after OLT, but also a deleterious effect in recurrent hepatitis C. We have previously shown that low doses of CsA reduce Treg function probably by inducing secretion of cytokines like IL-2 and interferon (IFN)- γ .²³ As corticoids are known to increase regulatory T-cell frequency and CD25 and FoxP3 expression in patients on corticoid therapy^{24–27} and as MMF may reverse the effect of anticalcineurin treatment on Treg,²⁸ maintaining their activity in vitro,²⁹ in this study we evaluated whether MMF or corticosteroids, usually used in combination with CsA, reversed the inhibitory effects of CsA on human CD4⁺CD25⁺ Treg cells.

MATERIALS AND METHODS

Donors, Cells, and Culture Conditions

Donor Cells. Human blood samples were collected from healthy adult donors after obtaining informed consent in accordance with approval of our Institutional Review Board. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on Ficoll-Paque PLUS gradients (GE healthcare Bio-sciences AB, Uppsala, Sweden).

Treg Isolation. The frequency of Treg in human peripheral blood is of 0.5% to 2% circulating PBMC and 2% to 5% total CD4⁺ T cells. Isolation of human Treg cells from PBMCs of adult donors was achieved using the CD4⁺CD25⁺ Treg cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Germany) according to the manufacturer's instructions. The CD4CD25 T-cell fraction was evaluated by cytometric and chemotaxis experiments. Flow cytometric analysis showed that the enriched fraction to contain >95% CD4⁺CD25⁺ cells. (data not shown).

Culture Conditions and Drug Treatment

All cultures were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mmol/L L-glutamine (1%) 0.02 mmol/L sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 10% heat-inactivated human AB serum. Cultures were incubated in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. CsA (10 to 400 ng/mL; Sigma-aldrich) dissolved in absolute ethanol was used in cultures as previously published data.^{23,24} MMF (Roche) was used as the mycophenolic acid active form (100–1000 ng/mL). Corticoids (dexamethasone, Sigma-Aldrich) was added to cultures at 10⁻⁶ and 10⁻⁹ mol/L.

Each immunosuppressive drug was tested on different samples due to the low isolated cell number, reflecting the limited Treg frequency in human blood.

Flow Cytometric Analysis

Cell phenotype was analyzed by flow cytometry. Treg washed cells were labelled with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs). For membranous staining, samples were incubated with the following antibodies: CD4-PE-Cy5 (BD Pharmingen), CD25-PE (Miltenyi Biotec, Germany) and CD127-FITC (Clinisciences). For intracellular staining, cells first labelled with surface mAb, were fixed and permeabilized with FoxP3 staining buffer kit (Miltenyi Biotec, Germany) for FoxP3 staining with anti-FoxP3-FITC (Clinisciences), according to the manufacturer's instructions. Appropriate isotype control mAbs were used for marker settings. The results presample herein were the most representative from four experiments.

Mixed Leukocyte Reaction

Treg suppressive activity was measured by inhibition of proliferative responses of autologous PBMC in mixed leukocyte reaction (MLR). Assays included 10⁵ responders PBMC with 6 \times 10⁴ CD25⁺ cells alone and a PBMC:CD25⁺ (2:1) mixture in round bottom 96-well plates for 48-hours cultures. Cells activated with plate-bound anti-CD3 antibodies (1 μ g/mL) were incubated at 37°C for 2 hours before the culture; soluble anti-CD28 antibodies (Clinisciences); 100 ng/mL) were added at the time of initiation. Each assay was performed in triplicate with proliferation measured after [methyl-³H]-thymidine (1 μ Ci/well; GE Healthcare) incubation for the last 18 hours before harvest. Radioactivity was determined using a β -counter (1450 Trilux, Wallac, Finland). Results were expressed as a proliferative index with mean value \pm standard deviation of four experiments.

Treg Proliferation Assay

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells proliferate in the presence of anti-CD3 (150 ng/mL), anti-CD28 (100 ng/mL), IL-2 (300U/mL; Preprotech Inc, USA) and autologous irradiated (5000 rad) PBMC.^{31,32} Each proliferation assay was performed in triplicate with proliferation was measured as described above for MLR.

Statistical Analysis

The significance of MLR results was evaluated using the statistical rank sum Mann-Whitney test with Sigma-stat software.

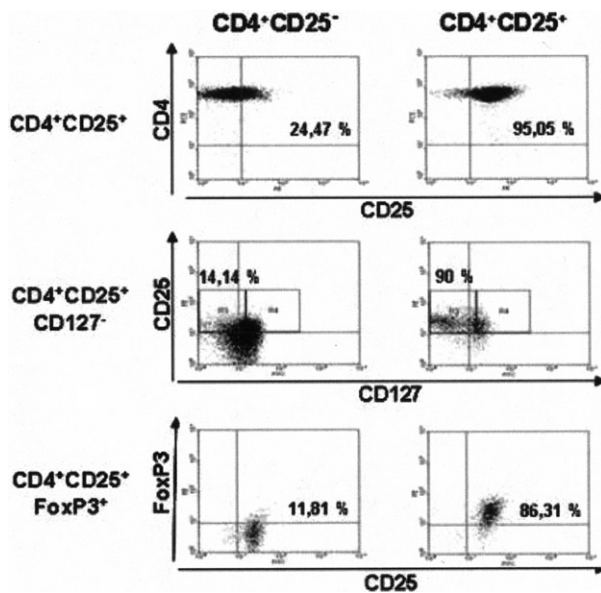


Fig 1. Phenotypical characterization of freshly isolated Treg. Cell purity of CD4⁺CD25⁺ fraction was analyzed by FACS and is superior to 95%, based on CD4 and CD25 expression. Whereas CD25⁻ cells intermediate CD25 surface expression or have no detectable expression at all. Ninety percent of freshly isolated T-regulatory cells (Treg) are CD127⁻ low, whereas in CD25⁻ fraction, most of cells are CD127⁺. FoxP3 expression is >80% in Treg isolated fraction and only 10% in CD25⁻ fraction. Flow cytometric analysis of Treg markers allows us to discriminate between CD25⁺ and CD25⁻ fractions.

RESULTS

Phenotypical Characterization of Freshly Isolated CD4⁺CD25⁺ Treg

Treg associated proteins—CD25, CD127 and FoxP3—were assessed by flow cytometric analysis. CD4⁺ and CD25⁺ expressions were greater than 95% (Fig 1A); only 14% of CD25⁻ cells were CD127⁻, whereas 90% of Treg were CD4⁺CD25⁺ and CD127⁻; 80% of isolated Treg expressed FoxP3 whereas only 12% of the CD25⁻ fraction was FoxP3 (Fig 1).

Effect of CsA on Treg Activity

Tregs inhibited PBMC proliferation by $33\% \pm 6.1\%$ in an MLR performed with PBMC and Tregs at a ratio of 2:1 (Fig 2A). CsA showed some inhibition of Treg suppressive activity at 20 ng/mL, but it became significant at 40 ng/mL $20\% \pm 6.1\%$ versus $33\% \pm 6.2\%$ vs controls ($P = .06$); and $17\% \pm 8.4\%$ ($P = .034$), respectively.

Effect of CsA/Steroids Combination Therapy on Treg Activity

Steroids are usually used in combination with CNI after OLT on dexamethasone (Dexa; 10^{-9} and 10^{-6} mmol/L) inhibit PBMC proliferation in a dose-dependent manner (Fig 2B) Dexa (10^{-9} mmol/L) increased by Treg prolifera-

tion about $50\% \pm 10\%$ ($P = .041$), in contrast to ineffectiveness of Dexa 10^{-6} mmol/L (Fig 2B). Dexa did not interfere with the Treg suppressive activity, in a MLR of PBMC and Treg (Fig 2C). In combination experiments, PBMC proliferation was inhibited in the presence of CsA or Dexa 10^{-9} mmol/L alone, but the combination did not increase the effect (data not shown). MLR or PBMC plus Tregs (2:1) were assessed in the presence of CsA 40 ng/mL and Dexa 10^{-9} mmol/L. Low doses of CsA inhibited Treg activity ($P = .034$), whereas Dexa 10^{-9} mol/L preserved this activity, combination did not reverse the inhibitory effect of CsA ($P = .017$; Fig 2D).

Effect of CsA/MMF Combination Therapy on Treg Activity

MMF is often used in combination with CNI. MMF 100, 200, and 350 ng/mL inhibited PBMC and Treg proliferation in a dose-dependent manner (Fig 3A). MMF (100–100 ng/mL) did not interfere with Treg suppressive activity (Fig 3B). PBMC and Treg proliferation was inhibited by CsA or MMF alone; the combination increased the effect (data not shown). MLR of PBMC and Treg were assessed in the presence of CsA 40 ng/mL and MMF 200 ng/mL. While 40 ng/mL of CsA inhibited Treg activity ($P = .034$), addition of MMF preserved the activity, reversing the inhibitory effect of CsA on Treg activity (Fig 3C).

DISCUSSION

This study was performed to examine whether MMF and corticosteroids reversed the inhibitory effects on human CD4⁺CD25⁺ Treg cell function of a CNI like CsA with which they are usually used on combination.

Treg are naturally anergic to in vitro antigenic stimulation with anti-CD3, anti-CD28, and high dose IL-2.³³ Various doses of CsA, MMF, or Dexa can not break this anergic state. Treg are known to proliferate after antigenic stimulation in the presence of high IL-2 concentration and autologous irradiated PBMC.^{31,32} We have previously shown that Treg proliferation can be inhibited by CsA^{23,24} and by MMF in dose-dependent fashion. In contrast, Dexa 10^{-9} mol/L significantly enhanced Treg proliferation herein ($P < .041$) consistent with enhanced Treg number and activity during corticotherapy.^{25–27}

Isolated Treg conserved their capability to inhibit the proliferation of activated PBMC. Interestingly, 40 ng/mL of CsA inhibited the suppressive capacity of Tregs, whereas higher concentrations had no effect. These results were consistent with these presented in recent study a rat cardiac allograft model: Kawai *et al* showed differential effects of CsA according to employing concentration abbeit with high CsA doses abrogating Treg cells activity.³⁴

As corticosteroids are known to increase the frequency of regulatory T cells and CD25 and FoxP3 expression^{25–27} we examined whether they could reverse the inhibitory effects of CsA on Treg activity. We confirmed that that corticoids enhanced the CD25 expression in vitro (data not shown). Moreover, they induced GITR expression on Treg, which is

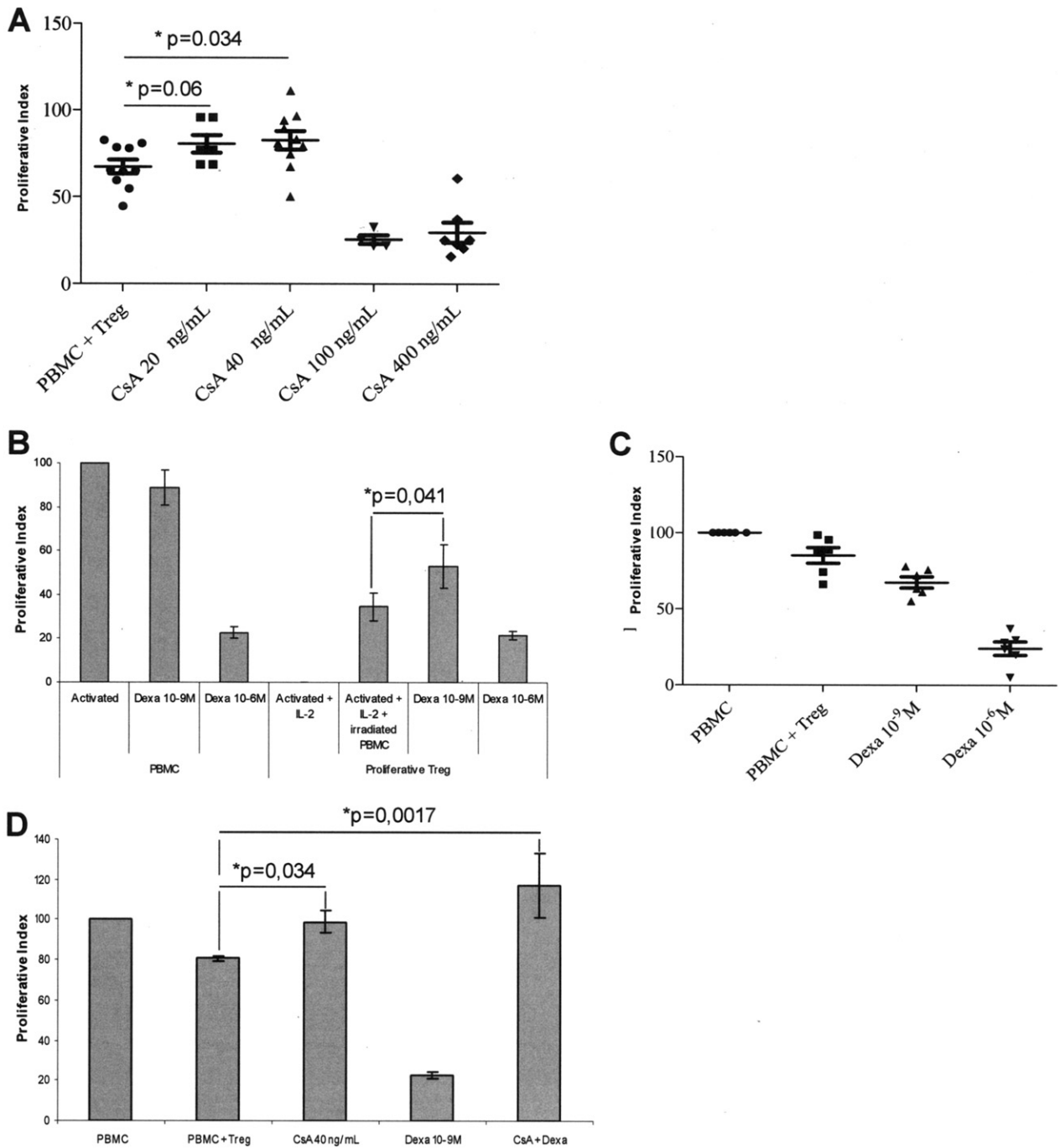


Fig 2. Dexamethasone (Dexa) could not reverse the cyclosporine (CsA) inhibitory effect on T-regulating cells (Treg) (A) model lymphocyte reaction (MLR) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Tregs at a 2:1 ratio were assessed in the presence of different doses of CsA. PBMC proliferation was significantly higher in MLR in the presence of 20 and 40 ng/mL of CsA ($P = .06$ and $P = .034$, respectively) than in the absence of the drug, suggesting that low doses of CsA inhibit regulatory T-cell function. The immunosuppressive capacity of Tregs was conserved when 100 ng/mL and 400 ng/mL of CsA were added to the cultures. (B) PBMC proliferation, induced by in vitro antigenic stimulation, is inhibited dose dependently by Dexa at 10^{-9} and 10^{-6} mmol/L. Dexa 10^{-9} mol/L is able to induce Treg proliferation ($P < .041$) whereas the 10^{-6} mol/L dose could not. (C) Dexa do not interfere with the Treg suppressive activity, in a MLR of PBMC and Treg (ratio 2:1). (D) MLR of PBMC and Treg in a 2:1 ratio were assessed in the presence of a combination of CsA 40 ng/mL and Dexa 10^{-9} mol/L. The low dose of CsA inhibits Treg cell activity, whereas Dexa 10^{-9} mol/L preserves this activity. The association of CsA and Dexa could not reverse the inhibitory effect of CsA on Treg activity. IL, interleukin.

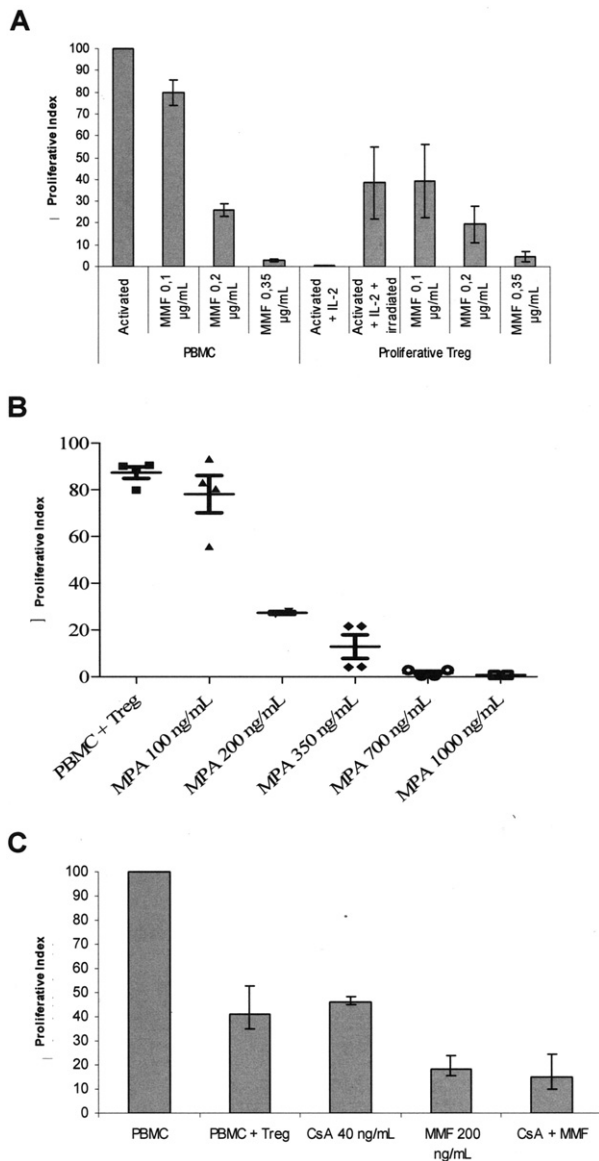


Fig 3. Mycophenolate mofese (MMF) could reverse the cyclosporine (CsA) inhibitory effect on T-regulatory cell (Treg). **(A)** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Treg proliferation, by in vitro antigenic stimulation, is inhibited dose dependently by the different concentrations of MMF (100, 200, and 350 ng/mL). **(B)** MMF does not interfere with the Treg suppressive activity, in a mixed lymphocyte reaction (MLR) of PBMC and Treg (ratio 2:1). **(C)** MLR of PBMC and Treg in a 2:1 ratio were assessed in the presence of a combination of CsA 40 ng/mL and MMF 200 ng/mL. The low dose of CsA inhibits Treg cell activity, whereas MMF preserves this activity. The addition of MMF to CsA could reverse the inhibitory effect of CsA on Treg activity. IL, interleukin; MPA, mycophenolic acid.

associated with suppressive activity.³⁵ Surprisingly, corticoids could not reverse the inhibitory effects of CsA on Treg activity, a result consistent with recently published data by

Prado *et al*, wherein corticoids enhanced expression of Treg markers but not their suppressive activity.³⁶ More recently, it has been shown that short-term corticoid therapy (14 days) did not apparently increase the frequency of circulating Treg, either in mice or in humans. In this study, Treg suppressive activity was conserved in vitro.³⁷

MMF is also known to reverse the effect of anticalcineurin treatment on Tregs,²⁸ maintaining their activity in vitro.^{29,30} Since, CsA is often combined with MMF, we examined whether it could reverse the inhibitory effects of therapeutic doses of CsA on Treg cell activity in vitro. In contrast to Dexamethasone, MMF reversed the inhibitory effects of therapeutic doses of CsA on Treg activity.

In conclusion, our data suggested that the combination of MMF and CsA maintained the activity of regulatory T cells and thus promoting tolerance after liver transplantation.

REFERENCES

- O'Garra A, Vieira P: Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 8:801, 2004
- Sakaguchi S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 4:345, 2005
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al: Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 18, 2001
- Stephens LA, Mottet C, Mason D, et al: Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 4:1247, 2001
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al: Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 9:5317, 1999
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, et al: A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 11:1142, 2005
- D'Cruz LM, Klein L: Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 11:1152, 2005
- Velasquez-Lopera MM, Eaton VL, Lerret NM, et al: Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2:127, 2008
- Joffre O, Santolaria T, Calise D, et al: Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 1:88, 2008
- Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, et al: Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 2:277, 2006
- Stenard F, Nguyen C, Cox K, et al: Decreases in circulating CD4+CD25hiFOXP3+ cells and increases in intra-graft FOXP3+ cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. *Pediatr Transpl* 1:70, 2009
- Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, et al: Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 1:390, 2006
- Curry MP: Hepatitis B and hepatitis C viruses in liver transplantation. *Transplantation* 7:955, 2004
- Velidedeoglu E, Mange KC, Frank A, et al: Factors differentially correlated with the outcome of liver transplantation in hepatitis B and hepatitis C virus recipients. *Transplantation* 12:1834, 2004
- Berenguer M: Outcome of posttransplantation hepatitis C virus disease—is it the host, the virus, or how we modify the host and/or the virus? *Liver Transpl* 10:889, 2002

16. Rodriguez-Luna H, Douglas DD: Natural history of hepatitis C following liver transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 4:363, 2004
17. Carpentier A, Conti F, Stenard F, et al: Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 9:2102, 2009
18. Firpi RJ, Soldevila-Pico C, Morelli GG, et al: The use of cyclosporine for recurrent hepatitis C after liver transplant: a randomized pilot study *Dig Dis Sci* 1:196, 2010
19. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al: An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 5:1062, 2004
20. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, et al: Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 12:7852, 2005
21. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al: T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 12:7860, 2005
22. Manigold T, Racanelli V, T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 12:804, 2007
23. Miroux C, Moralés O, Carpentier A, et al: Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells in vitro. *Transplant Proc* 41:3371, 2009
24. Miroux C, Morales O, Ghazal K, et al: In vitro effects of cyclosporine a and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation* 94:123, 2012
25. Azab NA, Bassyouni IH, Emad Y, et al: CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin Immunol* 2:151, 2008
26. Braitch M, Harikrishnan S, Robins RA, et al: Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 4:239, 2009
27. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, et al: Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 6:1425, 2004
28. Demirkiran A, Sewgobind VD, van der Weijde J et al: Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells. *Transplantation* 7:1062, 2009
29. Lim DG, Joe IY, Park YH, et al: Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2:94, 2007
30. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen et al: Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood* 3:1018, 2006
31. Earle KE, Tang Q, Zhou X, et al: In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol* 1:3, 2005
32. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, et al: Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 3:895, 2004
33. Thornton AM, Shevach EM: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 2:287, 1998
34. Kawai M, Kitade H, Mathieu C, et al: Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine A on the development of regulatory T cells in vivo. *Transplantation* 9:1073, 2005
35. Liao G, Nayak S, Regueiro JR, et al: GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunol* 4:259, 2010
36. Prado C, Gómez J, López P, et al: Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology* 216:386, 2011
37. Sbierra S, Dexneit T, Reichardt SD, et al: Influence of short-term glucocorticoid therapy on regulatory T cells in vivo. *PLoS One* 6:e24345, 2011

ARTICLE 5 (Revue)

Les lymphocytes T régulateurs naturels et induits contrôlent divers mécanismes de la réponse inflammatoire induite dans les cancers associés aux infections virale par VHC, HTLV1 et EBV.

Control of the Inflammatory Response Mechanisms Mediated by Natural and Induced Regulatory T-Cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-Associated Cancers

Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation, Volume 2014, Article ID 564296, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/564296>

Laurissa Ouaguia, Dhafer Mrizak, Sarah Renaud, Olivier Moralès and Nadira Delhem

Mots clés: Treg, HCV, HTLV-1, EBV, Immune Regulation

Résumé : Les infections virales sont impliquées dans l'inflammation chronique et, dans certains cas, le développement du cancer. En effet, bien qu'une infection virale active la réponse du système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène principalement par le biais des mécanismes inflammatoires, il est maintenant reconnu que cette inflammation est également favorable au développement des tumeurs. De nos jours, il est bien décrit que les virus, tels que le virus de l'hépatite C (VHC), le virus d'Epstein-Barr (EBV), le virus du papillome humain (HPV) ou le virus de T-lympho-tropique (HTLV-1), sont des facteurs de risque importants pour les tumeurs malignes. Le développement d'outils et de stratégies utilisés par ces virus afin de détourner la réponse immunitaire est principalement liée à l'activation des lymphocytes T régulateurs qui peuvent être naturels (Treg) ou induits (iTreg) et qui inhibent les réponses inflammatoires et anti-virales médiées par les cellules effectrices. La réponse inflammatoire est un mécanisme immunitaire fondamental qui implique plusieurs composants moléculaires et cellulaires, comprenant des cytokines et des chimiokines qui sont libérés par divers cellules pro-inflammatoires. Parallèlement à ce processus, certains composants endogènes recrutés, libèreront des médiateurs anti-inflammatoires afin de restaurer l'homéostasie tissulaire. Dans cette revue, nous proposons de résumer la compréhension du rôle des Treg et iTreg dans le contrôle et la résolution des maladies inflammatoires induites dans les cancers associés aux infections virales par le VHC, HTLV1 et EBV.

Review Article

Control of the Inflammatory Response Mechanisms Mediated by Natural and Induced Regulatory T-Cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-Associated Cancers

Laurissa Ouaguia,¹ Dhafer Mrizak,¹ Sarah Renaud,¹
Olivier Moralès,¹ and Nadira Delhem^{1,2}

¹ CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université Lille-Nord de France, SIRIC ONCOLille, Institut Pasteur de Lille, IFR142, 1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex, France

² UFR de Biologie, Université de Lille 1, Cité Scientifique, Bâtiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Correspondence should be addressed to Nadira Delhem; nadira.delhem@ibl.fr

Received 14 March 2014; Revised 18 June 2014; Accepted 30 July 2014; Published 30 November 2014

Academic Editor: Constantino López-Macías

Copyright © 2014 Laurissa Ouaguia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Virus infections are involved in chronic inflammation and, in some cases, cancer development. Although a viral infection activates the immune system's response that eradicates the pathogen mainly through inflammatory mechanisms, it is now recognized that this inflammatory condition is also favorable to the development of tumors. Indeed, it is well described that viruses, such as hepatitis C virus (HCV), Epstein Barr virus (EBV), human papillomavirus (HPV) or human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1), are important risk factors for tumor malignancies. The inflammatory response is a fundamental immune mechanism which involves several molecular and cellular components consisting of cytokines and chemokines that are released by various proinflammatory cells. In parallel to this process, some endogenous recruited components release anti-inflammatory mediators to restore homeostasis. The development of tools and strategies using viruses to hijack the immune response is mostly linked to the presence of regulatory T-cells (Treg) that can inhibit inflammation and antiviral responses of other effector cells. In this review, we will focus on current understanding of the role of natural and induced Treg in the control and the resolution of inflammatory response in HCV-, HTLV-1-, and EBV-associated cancers.

1. Introduction

Cancer is a serious disease and a leading cause of death in the world. It can develop after a bacterial, parasitic, or viral infection [1]. Viruses and bacteria can cause chronic inflammation and are thought to contribute to more than 1.2 million cases of infection-related disease per year [2, 3]. For example, hepatitis C virus (HCV), Epstein Barr virus (EBV), human papillomavirus (HPV), Kaposi sarcoma-associated herpes virus (KSHV), and human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) are important risk factors for malignancies such as hepatocellular carcinoma (HCC), nasopharyngeal carcinoma (NPC), cervical cancer, Kaposi sarcoma (KS), and Adult T-cell leukemia (ATL), respectively [4–6]. Such viruses act through inflammation-related mechanisms in addition to the

inhibition of tumor suppressive genes [7]. It has been shown that some viral cellular transformations happen when the virus genome interacts with the DNA of the host cell. Those viruses are called oncogenic viruses, that is, human tumor-viruses [5, 8]. Thereby, this results into uncontrolled cell growth that occurs with the invasion of surrounding tissues and the spread of malignant cells. The viral infection or the presence of a tumor cell activates the immune system's response involving a wide range of components that are resumed under two general responses: the “innate immune response” involving mainly neutrophils, monocytes, and dendritic cells and the “adaptive immune response” which implies B and T lymphocytes. The innate response provides the first line of defense against invading pathogens. It leads to the halt of the initial spread of infection but also activates the adaptive

immunity and other secondary host defense mechanisms [9, 10]. The adaptive immune response is mediated by the B and T lymphocytes [11, 12]. The major goal of this immune response is to eradicate the pathogen mainly through inflammation mechanisms [13]. Indeed, inflammation and immunity probably affect different stages of cancer development with inflammation and innate immunity most commonly exerting protumorigenic effects while adaptive immunity potentially exerts antitumorigenic effects [14]. However, it is now recognized that the inflammatory condition is favorable to the development of tumors [2, 15]. Nevertheless, the inflammation's role in a wide variety of diseases such as cancer has just been evaluated [14, 16]. While acute inflammation seems to be a part of the antipathogenic response, chronic inflammation can also lead to cancer [16].

The inflammatory response is a fundamental immune mechanism known to be a localized protective reaction of tissue against irritation, infection, injury, allergy, and tumors. Inflammation is characterized by redness, pain, and thickness. This process involves several molecular and cellular components consisting of lipid inflammatory mediators (leukotriene, prostaglandin, etc.) and cytokines (IFN γ , TNF α , IL2, IL12, etc.), as well as chemokines (CCL20, CXCL10, CCL22, CCL17, etc.), that are released by various proinflammatory cells such as T helper (Th)1, Th17, Th9, Th22, monocytes, macrophages, dendritic cells, and cancer cells themselves [6, 13, 15, 17–19]. The release of proinflammatory factors by such cells leads to the recruitment of numerous proinflammatory cells to the infection site [6]. At the same time, a number of other cells are also recruited in order to control the inflammation and to avoid chronic inflammation, a characteristic in many chronic diseases such as cancer. Thereby, some endogenous recruited components would release anti-inflammatory and proresolving mediators to restore homeostasis. The HCV antigens will activate the humoral and cellular immune responses. The development of mechanisms and strategies by the immune system to restore immune homeostasis is mostly linked to the presence of Th2 but primarily to regulatory T-cells that can inhibit inflammation and the responses of others effectors cells [11, 19, 20].

Regulatory T-cells (Treg) are specialized subsets of the adaptive immune response which are able to recognize antigen peptides presented by MHC classes I and II via their TCR. Treg cells suppress the autoreactive T-cells, reduce inflammation, induce tolerance, and modulate the immune response of the host in the context of autoimmune pathologies, allergies, or virus-induced cancers [10, 19]. The “suppressor T-cells” hypothesis was enunciated by Vadas and his collaborators in 1976 but the common term “regulatory T-cells” appeared for the first time with Sakaguchi in 1995 [21, 22]. In Humans, the lack of Treg cells is associated with a multisystemic autoimmune disease known as IPEX (i.e., immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy, X-linked syndrome) [23]. Therefore, Treg cells seem to be major inhibitors of autoimmune diseases.

For a decade, Treg have been widely described to be involved in cancer. Indeed, most of Treg cells are chemoattracted to tumor tissues where they proliferate locally and differentiate into different Treg cell subpopulations that strongly

suppress the activation and the expansion of tumor-antigen-specific effector T-cells [18, 20]. CD4+ regulatory T-cells refer to the major Treg subset that has been described for decades. Depending on their origin and the expression of cell surface markers, we can distinguish 2 different types of CD4+ regulatory T-cells in humans. Briefly, the first type is a natural regulatory T-cells (nTreg) deriving from thymus. *In vitro*, those cells are anergic and are characterized by a high expression of the transcription factor forkhead box 3 (FOXP3), a constitutive cell surface expression of CD25 (the interleukin-2 receptor alpha-chain), and both cell surface and cytoplasmic expression of CTLA4 (the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen 4) [11, 19, 23]. Since their description, several extra molecules have been put forward as Treg markers. This includes GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family related protein) [24], PD-1 (programmed death 1), LAG3 (lymphocytes activation gene 3) [20, 25], HLA-DR [26], CD45RA/CD45RO [27], CD62L (L-selectin), CD44, CD28 (costimulatory molecule), CCR7 (chemokine (C-C motif) receptor 7), CXCR4, OX40 (CD134), Folate receptor-4 [28], and CD39 [29]. Natural Treg cells were also characterized by a lack or reduced expression of CD127 (the interleukin-7 receptor alpha-chain) [30]. It has been demonstrated that nTreg exert their suppressive functions either through cell-to-cell contact-dependent mechanisms via membrane-bound molecules or through the secretion of immunosuppressive cytokines [31]. For example, the high CD25 expression on nTreg cells gives it the ability to consume large concentrations of the proliferative cytokine IL2 and thereby, nTreg may inhibit the proliferation and induce apoptosis of surrounding T-cells. Moreover, CTLA4 interacts with CD80/CD86 and thus inhibits the T-cell costimulation. In addition, nTreg cells produce TGF β (transforming growth factor beta) and IL10 (interleukin 10) to reduce antigen presentation, to prevent antigen presenting cells (APCs) maturation and to induce cell cycle arrest. By CD39 and CD73 expression, nTreg cells also inhibit the ATP metabolism and thus promote cell cycle arrest [31]. The second regulatory CD4+ T-cell population consists of induced or adaptive Treg cells that can be divided into 3 subsets. First, we distinguish Tr1 or T regulatory type 1 cells which secrete vast quantities of IL10 associated with a mild secretion of TGF β . This subset is characterized by a CD4, CD18, CD49b, LAG3, and GATA-3 expression, lack of FOXP3, and relative CD25 expression [32]. Tr1 are anergic *in vitro* and they suppress the cell proliferation through their IL10 production [33]. Secondly, we distinguish Th3 or T helper 3 that can be characterized by a mild production of TGF β , IL4, and IL10. Due to TGF β presence, naïve CD4+ T-cells can differentiate into Th3 cells which possess an important role in negating autoimmune reactions and promoting oral tolerance. There is some evidence suggesting that Th3 cells can express some nTreg molecules such as CD25, FOXP3, and CTLA4 [27, 34]. The third subset of iTreg, and the less studied, is iTReg35 or IL35-producing-CD4+ T-cells. Recently, it has been shown that IL35, made up of two subunits IL12p35 and Ebi3, may induce the emergence of regulatory T-cells that mediate the suppression in a IL35-dependent manner [11, 19, 25, 35–37]. In general, induced regulatory CD4+ T-cells result from the

peripheral differentiation of effector T-cells according to the nature of the antigen or to the cytokinic environment [11, 36, 38]. As such, they represent the major subset of Treg present in cancer [39].

Other T-cell populations that have been described to exhibit regulatory functions are composed of CD8⁺ Treg [27, 40] and CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg cells [41]. These cells subsequently decrease the priming of cytotoxic CD8⁺ T-cells, regulate the immune response by cell-to-cell mechanisms, and promote the development of tolerance [42]. Some CD8⁺ Treg subsets are characterized by the expression of numerous markers like CD25, CTLA4, FOXP3, HLA-DR, CD28, LAG3, and GITR. Their suppressive function is exerted in a cell-to-cell contact-dependent manner like that observed in nTreg. Some CD8⁺ Treg cells may have a thymic origin while others possess a peripheral one. Besides, there are also natural killer regulatory T-cells (NKT Treg) generated from the thymus that can be CD4⁺, CD8⁺, CD4⁻CD8⁻, or CD4⁺CD8⁺. The latter secrete IL4, TGF β , and IL10 to induce APCs cytotoxicity by a cell-to-cell contact-dependent mechanism [43]. Another small subset of Treg is gamma delta T regulatory cells associated with the mucosal tolerance in Human [44].

To sum up their functions, Treg cells (natural and induced) provide an important mechanism for the maintenance of central and peripheral self-tolerance [11, 20]. Treg exert their suppressive abilities to inhibit the effector's cytotoxic antiviral and antitumoral responses in the tumor cells environment [19]. By such skills, Treg favor the establishment and persistence of many pathogens like viruses and could then promote the progression of virus-related cancers [45].

Until today, the role of Treg in cancer development and progression is not clear. Indeed, Treg appear to play a dual role in cancer. Earlier evidence have suggested that Treg cells accumulate in tumors and peripheral blood of cancer patients and through suppression of antitumor immune responses promote tumor growth such as in hepatocellular carcinoma [46, 47], nasopharyngeal carcinoma [48], cervical cancer, Kaposi sarcoma, ovarian cancer, and melanoma [49]. This is the reason why Treg cells are often associated with a bad prognosis in cancer [36, 37, 46, 47, 50, 51]. However, other evidences indicate that in certain cancers, such as colorectal carcinoma [38], Hodgkin lymphoma, and estrogen receptor (ER) negative breast cancer, Treg suppress the pathogenic agent and thus are of good prognosis [52]. Such a difference implies that the clinical and prognostic outcomes of Treg in cancer depends on environmental factors including infectious agents, tumor-derived products, and locally-produced cytokines, which shape the nature of immune responses, including Treg generation, recruitment, and function [39, 53].

In this review, we will focus on current understandings of the role of natural and induced Treg in the control and resolution of inflammatory response in HCV-, HTLV-1-, and EBV-associated-cancers.

2. Role of Treg Cells in the Inflammation Associated with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma

Based on the data obtained from WHO in 2008, hepatocellular carcinoma (HCC) represents the fifth cause of death in

men and the seventh in women worldwide [1]. In general, HCC is the third most common cause of cancer related death [54]. The incidence of HCC correlates with the incidence of hepatitis C and B infections [55]. HCC is one of the most aggressive cancers with an overall survival rate of 10% in 5 years, even in developed countries [56]. HCC is a heterogeneous tumor of varied etiologies. The hepatocarcinogenesis is an asymptomatic and complex multistep process developing, in most cases, after decades of chronic liver disease, leading to the progressive accumulation of genetic and epigenetic alterations such as oncogenic activation, inactivation of tumor suppressive genes, and activation of cell proliferation pathways, release of angiogenic and growth factors that result in the malignant transformation of a healthy liver cells [57]. Nevertheless, it is still unclear at what stage the cumulative disorders become irreversible. The only effective approaches for patients with HCC are resection or liver transplantation. It has been reported that HCV infection increases the risk of HCC through the development of hepatic fibrosis and cirrhosis [58, 59]. Indeed, HCV infection is a persistent disease with a majority of patients remaining asymptomatic. However, in some individuals, the disease progresses at a variable rate from active inflammation to fibrosis and possibly cirrhosis. The onset of cirrhosis precedes the appearance of liver-related complication such as the development of hepatocellular carcinoma [5].

Based on a recent study, we know that hepatocarcinogenesis is promoted by an accelerated cellular turnover induced by chronic tissue damage and permanent cell regeneration in a context of chronic inflammation and sometimes after a viral infection [60]. Following HCV and HBV infection, human hepatocytes express and present the viral antigens to CD4⁺ T and CD8⁺ T-cells which are able to clear the virus by noncytolytic and cytolytic effector functions [61]. There is growing consensus that CD8⁺ T response plays a central role in the inhibition of the viral replication mediated by cytokines and direct killing of infected hepatocytes [62]. The CD4⁺ activation may direct Th1 response with the secretion of IL2, TNF α , and interferon (IFN) [9]. In addition, HCV CD4⁺ T stimulation may also induce Th2 cells which secrete IL4, IL5, IL10, and IL13 [13]. More recently, a third population, Th17, has been described to be involved in hepatic chronic inflammation following HCV and HBV infection [4, 63]. Th17 are induced proinflammatory CD4⁺ T-cells characterized by their ability to secrete specific inflammatory cytokines such as IL17, IL21, IL22, IL6, and IL26. In HCV-derived HCC, numerous Th17 cells have been described within the tumor [64]. Th17 exhibits either proinflammatory or protumoral functions [65] and a high proportion of Th17 cells have been described in advanced tumoral stages [66]. Several studies have mentioned that a large number of HCC patients exhibit those specific inflammatory immune responses. In fact, the HCV-HBV-associated HCC microenvironment is colonized by infiltrated inflammatory immune cells such as macrophages, NK, B, and T lymphocytes [67]. It has been reported that tumor cells release a number of cytokines and chemokines factors [9, 67, 68]. The production of these inflammatory factors may be linked to the viral hepatocarcinogenesis and it was reported that these inflammatory

cytokines are involved in the activation of the NF κ B pathway [69–72]. Nevertheless, in most patients the tumor progresses despite this immune response. This strongly suggests that HCC escapes from the immune response and this might probably be due to the HCC suppressive microenvironment which is known to play a key role in tumor progression. In fact, liver is a special organ with a unique regulatory microenvironment with certain liver sinusoidal cell populations that actively promote the induction of tolerance rather than immunity [46, 47, 62]. Numerous immune regulatory mediators such as IL10 and TGF β are secreted by Kupffer cells and stellate cells towards innate and adaptive immune inflammation [62]. In addition, liver cells are also characterized by the constitutive expression of tryptophan-2,3-dioxygenase that convert tryptophan into regulatory components as well as the indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) which is induced during inflammation via interferon signaling and is implicated in the production of immune regulatory components [73]. Another mechanism in inflammation control is the constitutive expression of arginase by hepatic cells, an enzyme which inhibits the lymphocytes proliferation [74]. Moreover, in some patients, tolerogenic hepatic cells may prime BCL-2 interacting mediator of cell death (BIM) which can induced T-cell apoptosis [70].

Unlike other Viruses, HCV does not cause a systemic ablation of the immune system but is rather associated with a form of specific tolerance much like the immune response to HCV; it is stopped and is unable to eliminate the virus [75]. Very interestingly, it has been described that infected hepatic cells overexpress programmed death ligand 1 (PDL1) which is the immunosuppressive ligand for PD1. Besides, HCV hijacks specific effector T-cells, so they express immunomodulatory factors such as CTLA4, Tim3, and 2B4 (CD244) followed by the decrease of their IFN secretion, mainly by iTreg [76, 77]. The cytokine's secretion controls the immune and inflammatory environment to either favor antitumor immunity or enhance tumor progression through IL10, TGF β , IL6, IL17, or IL23 [72]. The immune suppressive network within the HCC microenvironment is probably one of the major obstacles to the success of cancer immunotherapy.

Through their own proteins, some viruses such as HCV could also inhibit the immune inflammation. In the past, several papers have demonstrated that HCV-Core and NS5A proteins are involved in immune suppression by inducing effector T-cells apoptosis [78–80]. Furthermore, E1, E2, and NS3/4 are also involved in the modulation of endoplasmic reticulum stress, modulation of the PKR pathway, and cell transformation, respectively [81]. All these HCV features give the virus the ability to regulate the immune response and thus favor virus persistence. HCV infection appears to interact closely with the immune cells by infecting lymphoid cells [82].

Another explanation of this phenomenon could be the differentiation and/or recruitment of intrahepatic regulatory T-cells which is probably one of the key factors of the disease progression. It has been shown that natural regulatory CD4+ T-cells are highly recruited within the HCC where they secrete IL10 and TGF β to suppress the antitumor response and promote the tumor growth [62, 67, 83]. These Treg

cells suppress the proliferation and cytokine secretion of HBV- and HCV-specific effectors T-cells in a cell-to-cell contact-dependent manner [62]. More interestingly, it has been described that CD4+CD25+FOXP3+ Treg cells were highly enriched with TIL (tumor infiltrating lymphocytes) in advanced-stage HCC-patients [84, 85]. These HCC-Treg cells may suppress effector cells' proliferation, activation, cytokine secretion, degranulation, and cytotoxic compounds production [84, 85]. *In vitro* experiments also revealed that isolated HCC-infiltrating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T-cells can directly delete the cytotoxic function and the IFN γ secretion of some effector TIL in a TGF β - and IL10-dependent manner [62, 86]. Moreover, it has been shown that the CD4+CD25+ T-cells fraction isolated from peripheral blood mononuclear cells of infected patients might suppress the virus-specific CD8+ T-cells proliferation, the antiviral immune response, and a depletion of this fraction resulted in increased IFN γ production [85, 87]. Interestingly, an increased quantity of circulating nTreg and FOXP3+ Treg cells was associated with high mortality and poor survival time of HCC patients [46, 84]. Treg cells can also suppress the proliferation and cytokines production of HBV- and HCV-specific CD8+ T effector cells through IL10 and TGF β cytokine production [62, 84]. Indeed, some results showed that a proportion of FOXP3+CD4+ Treg cells may secrete IL10, a cytokine which promotes HCV persistence through its suppressive function on effector T-cells. Moreover, others reveal HCV-specific IL10 producing type 1 Treg (Tr1), found in persistent HCV infections [88, 89]. In addition, an upregulation of Th3 cells and Tr1 cells has been described in early chronic HCV infection which is characteristic of the immune modulation [90]. HCV is remarkable at disrupting human immune response to favor disease development until cancer. Indeed, recent studies revealed that HCV-infected hepatocytes drive nTreg development through the Tim3/Galectin-9 pathway. This pathway has also been shown to play a pivotal role in suppressing antiviral effector T-cells that are essential for viral clearance [91, 92]. Otherwise, it has been mentioned that CD25–FOXP3– Treg cells that possess suppressive abilities are increased in HCC-patients [83]. Other data showed that CD4+ Treg cells may upregulate Tim-3 expression there-with IL10 and TGF β production; Tim3/galectin9 interactions have also been shown to negatively regulate effectors T-cells [91]. Furthermore, there is some evidence of antigen specific induction of CD4+Treg cells (iTreg) after HCV infection. Indeed, other studies have shown that HCV may drive conventional CD4+ T-cells conversion into CD25+FOXP3+ Treg cells. In addition, others show that HCV variants may simultaneously upregulate inhibitory IL10, TGF β +Th3, and IL10+Tr1 cells which promote the inhibition of the T-cell proliferation [90]. The induction of iTreg may be favored by locally increased levels of TGF β and IL10 produced by infected hepatic cells and/or by recruited Treg cells. These induced Treg could be classified into CD4+TGF β +Th3 and CD4+IL10+Tr1 cells which secrete the immunosuppressive cytokines TGF β and IL10, respectively, in order to inhibit the inflammatory response [83, 90]. Otherwise, we and others have also demonstrated that Treg cells appear to highly accumulate within the hepatic tumor region compared with

the nontumor region [84]. Hence, Treg seem to closely interact with HCV and this may lead to an increase of their regulatory phenotype and function as well as increasing their ability to suppress the inflammatory immune response. Some studies have also mentioned that circulating Treg cells frequency was significantly increased and correlates with the disease progression in HCC patients [84].

In addition to CD4+Treg cells, there are also CD8+Treg cells present in persistent liver disease. In fact, FOXP3 expression was described on a fraction of CD8+ T-cells with a reduced ability to proliferate or secrete antiviral cytokines. These impaired CD8+ T-cells were associated with the coexpression of inhibitory receptors such as PD-1, CTLA4, TIM-3, and CD44. The CD8+ Treg cells appear to be involved in the inhibition of an efficient virus-specific T immune response [62, 93]. CD8+ Treg cells are known to produce high levels of IL10 and/or TGF β to suppress HCV-specific effector T-cells [94]. Taken together, the data strongly suggest that the function and frequency of regulatory T-cells have been shown to correlate in a proportionally inverse manner to the antiviral response. Therefore, the Treg cells are involved in the aggravation of liver disease, notably in the development of hepatocellular carcinoma [28].

3. Role of Treg Cells in the Inflammation Associated with HTLV-1-Induced Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) is a human disease associated with the infection of the retrovirus human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) [95]. It has been estimated that around 20 million people are infected with HTLV-1 worldwide [96]. HTLV-1 infection is a direct cause of ATLL, which can, through induction of immunodeficiency, indirectly cause many other chronic inflammatory diseases such as monoclonal gammopathy, chronic renal failure, strongyloidiasis, and HAM/TSP (HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis) [97–99]. In addition to the typical ATLL, HTLV-1 seems to be also associated with a Hodgkin-like ATLL disease, gastrointestinal tract tumor and leukemia [100, 101]. Leukemic cells can be infected by HTLV-1 as it possesses a proviral DNA which can integrate into the cell's DNA [100]. This proviral load may contribute to the development of HTLV-1-associated inflammatory conditions, since the number of circulating HTLV-1-infected T-cells in the peripheral blood is higher in patients with HAM/TSP than in asymptomatic HTLV-1-infected individuals [102].

HTLV-1 is the first human retrovirus that has been described [100]. It utilizes CD4+ T-cells as their main host and its pathogenicity may be due to an abnormal frequency and phenotype of CD4+ T-cells in infected patients [103]. Invasion by HTLV-1-infected T-cells, together with viral gene expression and cellular-signaling mechanisms, triggers a strong virus-specific immune response and increased proinflammatory cytokine production [6]. Cellular immune response has been implicated in the control of HTLV-1 infection as well as in the development of inflammatory alterations in patients [45]. Following HTLV-1 infection, the

viral antigen set induces host immune responses including B-cells for antibody production, cytotoxic T lymphocytes (CD8+ T-cells), and T helper cells (CD4+ T-cells). Under specific conditions, CD4+ T-cells differentiate towards Th1, Th2, and Th17 [6]. These cells produce a variety of proinflammatory cytokines, chemokines, adhesions molecules, and proinflammatory enzymes involved in chronic inflammation which are reactive oxygen species (ROS); tumor necrosis factor alpha (TNF α); IL1, 6, 8, and 18; nuclear factor-kappa B (NF κ B); hypoxia-inducible factor (HIF); IFN γ ; cyclooxygenase (COX); and so forth [16, 102]. Other results showed that ATLL cells could produce TNF α to mediate inflammation and the TNF α polymorphism was associated with increased susceptibility to develop ATLL in HTLV-1 carriers [104]. TNF α will activate the NF κ B pathway which acts as a crossroad for the secretion of inflammatory factors in cancer [16]. NF κ B transcription factor plays a key role in the host's antiviral response involving both the innate and adaptive arms of the immune response. Interestingly, HTLV-1 possibly exploits NF κ B for its replicative, widespread, and pathogenic functions [104, 105]. HTLV-1 encodes for several structural viral proteins as well as several regulatory proteins like Tax protein. Moreover, it has been described that the Tax transforming protein encoded by HTLV-1 persistently activates and binds to the TCR/NF κ B axis [106]. Thus, HTLV-1 Tax is one of the exogenous retrovirus genes responsible for immune dysregulation [6]. Otherwise, HTLV-1 infection can induce the overtranscription of IRF4 (interferon regulatory factor 4) which can block the caspase 3 activity and promote B-cell integration cluster (BIC). IRF4 is an oncogenic factor favoring tumor development [90]. Hence, IRF4 and BIC could play key roles in HTLV-1 tumorigenesis up to ATLL [90].

Many viruses are able to develop suitable strategies for modifying apoptosis in virus-infected cells or/and cancer cells. As the induction of apoptosis may result in the viral elimination, inhibition of apoptosis may result, in turn, in cell transformation and viral persistence. Interestingly, it has been shown that ATLL cells exhibit Treg cell-like suppressor activity [107]. HTLV-1 infection induces the expression of these regulatory proteins in order to favor viral cell latency, host cell proliferation, and persistent infection [103]. For example, through the inhibition of Th1 cytokine production, the HTLV-1-HBZ protein can impair cell-mediated immunity and promote immunodeficiency. In addition, HTLV-1 Tax could reduce the regulatory FOXP3 and cell surface markers CD38, CD62L, CTLA4, and GITR expression. Other studies reported that HTLV-1 Tax could induce the antiapoptotic protein Bcl-2 to enhance the survival of infected or ATLL cells [108].

ATLL is an aggressive malignancy in which neoplastic cells usually exhibit a CD4+CD25+FOXP3+ phenotype [109, 110]. It is known that regulatory FOXP3+ T-cells are characterized by the expression of the CD4 and CD25 markers and therefore, it has been hypothesized that ATL cells may be derived from Treg cells [11, 111]. In the early phase of ATLL, there is a period of autocrine growth of the leukemic CD4+ T-cells with the expression of IL2 and its functional receptors. Over time, IL2 production is lost, although the

cell surface expression of CD25 persists. Nowadays, regulatory CD4+CD25+ T-cell population is known as the main reservoir of HTLV-1 in HAM/TSP patients with more than 90% of Treg containing HTLV-1 proviral DNA and a higher expression of HTLV-1 Tax protein [112, 113]. Indeed, HTLV-1 usually infects regulatory CD4+FOXP3+ T-cells and this may facilitate persistent infection *in vivo*. This pattern could contribute to the pathogenesis of the virus-associated diseases [103]. In HTLV-1 infected patients, Treg cells may exert their suppressive function through the production of soluble factors acting at both long and short distances. Indeed, cytokines such as IL10 and TGF β have been related to the progression of the HTLV-1-related disease [114]. In addition, it has been shown that CD4+FOXP3+ Treg cells may also exert their regulatory effect on HTLV-1-specific CD8+ T-cells through a cell-to-cell contact-dependent manner with or without the involvement of cytokines [115]. Likewise, it has been reported that HTLV-1 infection increases the CTLA4 and GITR expression in Treg cells in order to increase the cell-to-cell suppressive mechanism [115]. For example, the CTLA4 molecule triggers the induction of IDO when it interacts with ligands in dendritic cells. ATLL cells exhibit immunosuppressive functions similar to Treg cells, and this may contribute to a clinically-observed cellular immunodeficiency in some patients [111]. Nevertheless, other studies reveal that some of these ATLL cells may lose their regulatory function with time [116]. Indeed, they described that TFG β signaling dysregulation and FOXP3 gene silencing could be involved in the pathogenesis of HAM/TSP. Hence, the viral pathogenesis could be improved by a loss of FOXP3 expression [115]. In addition, other results revealed that the level of FOXP3 expression was significantly decreased in CD4+CD25+ T-cells in HAM/TSP [113]. Based on the expression level of FOXP3 and CD45RA markers, we can distinguish three distinct subsets of CD4+ T-cells: (i) CD45RA⁺FOXP3⁺ resting Treg cells; (ii) CD45RA⁻FOXP3^{high} activated Treg cells; and (iii) CD45RA⁻FOXP3^{low} nonsuppressive Treg cells [117]. Several studies suggest that FOXP3+ATLL cells belong to these subpopulations meaning that ATLL cells may also fall into the group of nonsuppressive T-cells. This may explain the controversial outcomes of previous studies on the suppressive abilities of ATLL cells [118]. Moreover, other studies revealed elevated frequencies of nTreg, associated with poor prognosis in patients with acute leukemia [119]. In addition, some studies reported that FOXP3 induces high levels of miR155 expression in Treg cells for a better suppressive function [120]. miR-155 is a regulator of innate immunity, hematopoiesis, and lymphocytes homeostasis [121]. Most CD4+CD25+ATLL cells express FOXP3 transcription factor. Recently, other results showed that HTLV-1 could modulate the frequency and phenotype of FOXP3+CD4+ regulatory T-cells in virus-infected individuals [103]. HTLV-1 infected T-cells produce CCL22 through Tax protein which selectively attracts Treg cells. This phenomenon contributes indirectly to the generation and the maintenance of HTLV-1 uninfected FOXP3+cells [122]. Thereby, HTLV-1 selectively interacts with CCR4+FOXP3+CD4+ T-cells, resulting in preferential transmission of HTLV-1 to Treg cells [6]. This suppressive CD4+CD25+CCR4+ T-cell population is the predominant

viral reservoir of HTLV-1-associated ATL [102, 112]. In HAM/TSP patients, the Treg cell subset becomes Th1-like cells that overproduce IFN- γ . This is related to leukemia development and it promotes and maintains the FOXP3+ Treg phenotype in ATLL patients [6]. Moreover, other results described an increased regulatory phenotype such as CD39+CCR4+CD25+ FOXP3+CD4+ T-cells in HTLV-1 infected patients [6, 45]. Hence, HTLV-1 infection can modify FOXP3+ T-cells frequency and phenotype, promoting the central regulator of the host's immune response. Interestingly, other studies reported that a HTLV-1 infection may induce the appearance of iTreg from naïve T-cells involved in the suppression of the viral immune response [118, 123]. Taken together, these findings support the hypothesis that HTLV-1 is one of the exogenous retroviruses responsible for immune disruption along with the increase of FOXP3+ Treg frequency and phenotype. Therefore, HTLV-1 has acquired suitable strategies to achieve persistent infection and favor disease development up to ATLL outbreak in particular by its interactions with Treg cells.

4. Role of Treg Cells in the Inflammation Associated with EBV-Induced Nasopharyngeal Carcinoma and Hodgkin's Lymphoma

Epstein-Barr virus (EBV) is one of the most common human viruses, infecting more than 90% of the world's adult population. EBV is a lymphotropic γ -herpesvirus whose infection is associated with the development of several tumorous pathologies with a lymphoid or epithelial origin [124–128]. Although EBV is ubiquitous in the general population, in the majority of individuals it persists without causing any diseases. Nevertheless, in some individuals EBV has been implicated in the development of a wide range of cancers. The evidence of a link between EBV and nasopharyngeal carcinoma (NPC) and even Hodgkin's lymphoma (HL) is very strong and both are associated with EBV latency II profile [129].

NPC is an epithelial tumor of the head and neck associated with EBV in almost all cases [130, 131]. NPC is rare in Western countries but endemic in Southeast Asia and in North Africa with an incidence of up to 30–40 cases per 100,000 people in the region of Canton in Southeast China, this suggests a multifactorial etiology of NPC involving EBV infection, genetic predisposition, environmental factors, and other factors still unknown [132–137]. EBV plays a crucial role in NPC development but the comprehension of “when and how” the virus infects epithelial cells is still unsolved. Nevertheless we clearly know that the oral cavity is the gateway of the virus and that it spreads via oropharyngeal secretions and we also know that all NPC tumor cells bear EBV monoclonal viral genome [138–140]. Moreover, EBV is present in the neoplastic cells of approximately 40% of patients with HL, which is characterized by the presence of the malignant Hodgkin's and Reed Sternberg (HRS) cells. These cells only constitute a small part of the entire tumor and are surrounded by a rich background of T- and B-cells, macrophages, and

other inflammatory cells [141]. EBV can be detected in the HRS cells (HL) and in NPC cells, in which the virus expresses a limited subset of viral genes including the Epstein Barr nuclear antigen (EBNA)1 and the latent membrane proteins (LMP)1 and LMP2 [142]. Leukocyte infiltration, contrary to an anticipated immune-protective role, could contribute to tumor development and cancer progression. Several studies support the idea of local immune suppression that could explain the lack of efficiency of immune effector cells even after a correct homing.

An important biologic feature of NPC is the presence of a massive lymphoid infiltrate in the primary tumor, which is likely favored by inflammatory cytokines produced by malignant NPC cells [143–146]. It has been shown that most of tumor infiltrating leucocytes (TIL) are CD3+ T-cells with a small resting lymphocytes morphology [147]. Among the CD3+ cells, CD4, and CD8 T-cells are found in different proportions depending on the tumor specimens [148]. NK cells were also detected (around 5% of TIL) and small proportions of B-cells are also consistently detected [149, 150]. Dendritic cells are often found inside malignant cell nests whereas monocytes are more often interspersed at some distance of epithelial cell clusters [151]. Eosinophils are also detected in the leukocyte infiltrate of NPC tumors [152]. The leukocyte infiltrate consistently accounts for about 50% of the tumor mass and malignant epithelial cells play an active role in the formation of the infiltrate. Busson's group reported that NPC cells constitutively produce interleukin 1 alpha (IL1 α), an inflammatory cytokine [143], and this was confirmed by Huang and collaborators. Indeed, they detected IL1 α and β transcripts in most NPC primary tumors, in metastatic lesions, and its absence in control fragments of nonmalignant nasopharyngeal mucosa [144]. IL1 β was recently described in the recruitment of neutrophils in NPC tumor and it is associated with a better survival rate of patients [153]. Moreover, the inflammatory cytokine IL18, which has structural similarities with IL1, was shown to be consistently produced by malignant NPC cells but not by epithelial cells of the nonmalignant mucosa [154]. Other studies focused on chemokines expression in NPC by showing a consistent expression of CXCL10 by malignant NPC cells. It is known that CXCL10 induces chemotaxis of activated T-cells through its interaction with the CXCR3 receptor. CXCR3 chemoreceptor is associated with Th1 differentiation and is detected in a fraction of T-cells infiltrating the NPC [146].

The expression of several inflammatory cytokines and cell-surface regulatory molecules in primary HRS cells and HL-derived cell lines has been investigated and the result shows that these cells especially produce IL1, 2, 5, 6, 7, 8, 13, 17, TNF α , TGF β , and CCL28. Through the expression of IL5, CCL28, and TNF α , HRS cells are involved in the recruitment of eosinophils that constitute part of the inflammatory infiltrate. IL5 is thought to play a role in eosinophil's differentiation and proliferation [155–158] while TNF α was described to be protumorigenic or antitumorigenic depending on the type of intracellular complex formed. The TNF α 's impact on cancer also depends on the intracellular signal and thus is triggered in response to TNF α binding to its cell-surface receptor [159, 160]. The expression of IL6 and IL7 by HRS

cells was involved in the growth and differentiation of B- and T-cells, respectively [158, 161–163]. Moreover, it was reported that HRS cells express both IL6 and IL13 as well as their receptors suggesting that these cytokines may act as potential autocrine growth factors for HRS cells [163–166]. HRS cells also express a number of cytokine receptors and growth factors including IL2R, IL3R, IL4R, IL6R, IL9R, IL13R, CCR7, and CXCR4 [161, 167–169]. Many ligands of these receptors are produced by the inflammatory cells of HL, thus enabling a cooperative crosstalk to take place between HRS cells and the reactive infiltrate. Otherwise, the HL-TIL were shown to express several cytokines such as IL8, IL12, CCR4, and TGF β . For example, TIL express IL12 in most cases of HL, particularly in EBV-positive cases [170]. IL12 is important for Th1 differentiation while CCR4 expression contributes to Th2 recruitment [171].

Regarding the immunosuppressive cytokine IL10 in NPC microenvironment, three groups detected it in malignant cells using immunohistochemistry [172–174]. In contrast, Beck's group has failed to detect IL10 transcripts by in situ hybridization in malignant NPC cells [175]. Furthermore, it is important to consider the local immunosuppression; the presence of abnormal quantities of Treg within the tumor site and peripheral blood is a clear indication of this immune suppression [176]. One important indication of the immune evasion in EBV-associated malignancies such as NPC and HL is the lack of immunogenicity of LMP1 antigen. This is an argument in favor of Treg increased activity in case of persistent viral infections. Marshall and collaborators suggested that LMP1 could increase Treg activity and develop this theory (2003). Indeed, they analyzed derived HL patients CD4+ T-cells and reported high levels of IL10 secreting regulatory T-cells (Tr1) associated with a high immunosuppressive activity in HL-TIL. Tr1 suppressive activity is essentially mediated by an IL10 secreting mechanism. Nevertheless, the same group revealed that the immune response was inhibited by a cell-to-cell contact-dependent mechanism; in fact, they described that regulatory activity was avoided by CTLA4 blocking [177].

Moreover, Khanna's group studied Treg capacity to suppress EBV latency antigen response in HL and showed that high expression levels of LAG3, which is a Treg marker [178], is associated with a LMP1/2 specific T-cells function loss within HL-TIL. They also showed regulatory properties in CD4+LAG3+ T-cells [179]. They have shown an association between LAG3 and EBV gene expression in tumorous tissues and that LAG3 was more frequently expressed than FOXP3 in lymphocytes. Those cells can only express one of the two markers. In peripheral blood, CD4+LAG3+ T lymphocytes were enriched with CTLA4 and GITR but not FOXP3; this phenotype was more frequent in patients with an active disease than those with an inactive one [179].

In order to understand Treg specificity in EBV infection, Voo and collaborators stimulated PBMC *in vitro* using EBNA1 peptides. They indicated that T-cells expansion included not only helper CD4+ T clones but also regulatory CD4+ T-cells which exhibit simultaneous regulatory phenotype and effective suppressive activity [180]; both cell types recognize the same EBNA1 epitopes. Moreover, the

suppressive mechanism is cell-to-cell contact-dependent, although some clones remain capable of suppression even in transwell assays; this shows a soluble inhibition which was neither IL10 nor TGF β [180]. Nevertheless, we must consider the Treg/T helper ratio and verify Treg expansion when using peptide vaccine in order to treat EBV associated diseases since this could have serious consequences on patients.

Marshall's group showed the immunosuppressive properties of HL-TIL and the capacity of LMP1 to stimulate Treg in healthy donors; then they suggested that LMP1 is involved in the Treg's increased activity in HL. They compared Th1, Th2, and Treg responses to LMP1 within PBMC and TIL in EBV-negative and -positive HL patients. EBV-positive HL patients presented, *ex vivo*, an increased number of both IL10-secreting and CTLA4+ cells comparing to EBV-negative HL patients in periphery and in lymph nodes. In most patients, both PBMC and TIL responses to LMP1 were characterized by IL10 secretion [177, 181]; this highlights the crucial role of IL10-secreting cells in favoring tumor immune evasion in EBV-positive HL patients.

Moreover, Treg are constantly detected in NPC biopsies. Lau et al. showed a significant expansion of CD4+CD25^{high} T-cells in 56 NPC patients comparing to healthy controls. They reported an average of 12% of CD4+CD25^{high}FOXP3+ T-cells within TIL and an average of 8,2% of CD4+CD25^{high} T-cells within circulating T-cells [176]. This high Treg frequency in NPC patients may partly compromise the chance of success of immunotherapy strategies targeting T-cells.

Very recently, we found that tumor NPC exosomes, which are nanoparticles that have immunosuppressive properties, interact with Treg, participate in their massive recruitment into the tumor, and enhance their suppressive activity. We also showed that NPC exosomes promote CD4+CD25^{high} T-cells conversion into iTreg. This conversion was accompanied by a dose-dependent TGF β secretion [48]. CCL20 or MIP-3 α is a chemokine that induces leukocyte migration into the inflammation site and regulates leukocyte trafficking through lymphoid tissues. Chan's group detected high CCL20 concentrations in serum samples from NPC patients [182]. We also showed for the first time, using both Western Blot and electron microscopy, the presence of CCL20 on exosomes and we demonstrated that it plays a crucial role in Treg recruitment into the NPC tumor microenvironment [48].

Although EBV-specific cytotoxic T-cells (CTLs) can be detected in HL patients and have been shown to kill LMP1 and LMP2 expressing cells *in vitro*, they are unable to eliminate EBV-infected tumor cells *in vivo* [183]. Several hypotheses have been made to explain the apparent inefficiency of the antitumoral immune response in HL patients. Some studies suggested that CD4+ T lymphocytes producing Th2 cytokines and chemokines could probably contribute to the local immunosuppression of Th1 cellular immune response [167, 184]. Others explain this failure by an increase in the recruitment of Treg [185–187].

It has been shown that the percentage of CD4+CD25+ nTreg is elevated in the peripheral blood of HL patients compared to healthy donors, as well as in the blood of patients having an active disease compared to those in remission [179, 188]. Their number is also increased in HL tumor

tissues where they are found in close proximity to HRS cells [177, 188, 189]. In addition, our group has recently pointed out that Tr1 was strongly recruited in HL patients. Indeed, it has been shown that an important increase of Treg and Tr1 marker genes (CD4, CD25, FOXP3, GITR, CTLA4, CD49b, CD18, P-Selectin, LAG3, and CD40L) expression levels in EBV-positive HL nodes compared to EBV-negative and control nodes. A similar increase was observed within immunosuppressive cytokine genes (IL10 and TGF β) expression and their receptors (IL10R α , IL10R β , and TGF β RII). Furthermore, an upregulation was also confirmed for the gene expression of several chemokines (CCL4, CCL5, CCL17, CCL22, CCL20, and CXCL9), known to strongly attract Treg and their receptors (CCR4, CCR5, and CCR7). Moreover, we confirmed an increase of Tr1 cells in EBV-positive HL patients by determining CD4, CD49b, CD18, and also IL10 protein levels in nodes and biopsies [190].

The role of Treg in EBV infection is interesting for many reasons and the elucidation of its role in primary EBV infection could facilitate the immunomanipulation at initial infection stages in order to limit infectious mononucleosis symptoms and prevent subsequent HL or NPC risk. Treg frequency and functional capacity could affect viral persistence level and then, the clarification of Treg role could partly explain EBV-associated tumor progression and attain the development of new therapeutic tools.

5. Conclusion

As discussed in this review, there is critical evidence for a strong relation between inflammation and cancer development. As noted above, HCV-, HTLV-1-, and EBV-infections activate the immune system's response involving a wide range of cellular components. The main goal of this immune response is to eradicate the pathogen mainly through an inflammation mechanism. The inflammation process involves the release of several cytokines and chemokines by various proinflammatory cells or by cancer cells themselves. The release of proinflammatory factors by such cells leads to the recruitment of numerous cells to the infection site. Numbers of these cells consist of Treg cells which control inflammation and avoid chronic inflammation. In this review, it has been reported that regulatory CD4+ T-cells were associated with a poor prognosis in HCC, ATLL, and NPC patients. It was also reported that HTLV-1, HCV, and EBV viruses increase the frequency and the activity of regulatory T-cells in infected patients. Both HCV and HTLV-1 were able to hijack the immune system, thus favoring the viral persistence. In addition, a high frequency of Tr1 cells was reported in Hodgkin Lymphoma and HCC patients with a high suppressive activity mediated through IL10. In HCV-related diseases, as well as in HTLV-1- and EBV-related diseases, regulatory T-cells overexpressed several cell surface markers and thereby, increase the cell-to-cell dependent suppressive mechanism. We also mentioned the important recruitment of regulatory nTreg and iTreg within HCC and NPC tumors. Otherwise, others results reported that EBV-associated NPC exosomes were able to induce the conversion of CD4+CD25^{high} T-cells

into nTreg. Similarly, there was some evidence of antigen specific conversion of CD4+ T-cells into iTreg (Th3 and Tr1) after HCV infection. Taken together, these data strongly suggest that the frequency of Treg is proportionally correlated to the aggravation of the disease. Nevertheless, there are some noticeable differences in the involvement of Treg cells in these diseases. First, it is well known that HCV and HBV viruses are essentially hepatotropic even if some recent studies have suggested a possible lymphotropism. In contrast, natural regulatory CD4+CD25+FOXP3+ T-cells have been specifically described as the main HTLV1 reservoir. This close interaction between Treg and HTLV-1 results in preferential transmission of HTLV-1 to Treg cells promoting the central regulator of the host immune response *in vivo*. Secondly, the Treg suppressive activity in HCV infection passed mainly through cytokine production while in HTLV-1 infection, it was mainly through a cell-to-cell dependent mechanism. Others reported results suggesting that ATLL regulatory T-cells may lose their suppressive function with time but no studies have reported this in HCC, nor in NPC. In all cases, regulatory T-cells can directly inhibit the effector cells proliferation, cytotoxic function, cytokine production, and antiviral response. These regulatory cells produce high amounts of IL10 and TGF β , promoting the virus to achieve persistent infection. These viruses can increase both the frequency and phenotype of Treg cells and can therefore increase their suppressive function. Finally, these findings describe how viruses develop intelligent strategies to achieve persistent infection and, sometimes, the development of tumors. Viruses may directly induce dysfunctions of the host's immune response to increase their pathogenicity and then, the regulatory mechanisms of the immune inflammatory response are of major importance.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

- [1] <http://www.who.int/cancer/en/>.
- [2] F. Balkwill and A. Mantovani, "Inflammation and cancer: back to virchow?" *The Lancet*, vol. 357, no. 9255, pp. 539–545, 2001.
- [3] H. Kuper, H.-O. Adami, and D. Trichopoulos, "Infections as a major preventable cause of human cancer," *Journal of Internal Medicine*, vol. 248, no. 3, pp. 171–183, 2000.
- [4] Q. Chang, Y.-K. Wang, Q. Zhao, C.-Z. Wang, Y.-Z. Hu, and B.-Y. Wu, "Th17 cells are increased with severity of liver inflammation in patients with chronic hepatitis C," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 27, no. 2, pp. 273–278, 2012.
- [5] T. J. Liang and T. Heller, "Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma," *Gastroenterology*, vol. 127, pp. S62–S71, 2004.
- [6] N. Araya, T. Sato, N. Yagishita et al., "Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease," *Viruses*, vol. 3, no. 9, pp. 1532–1548, 2011.
- [7] L. M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860–867, 2002.
- [8] X. Chen, S. A. Kamranvar, and M. G. Masucci, "Tumor viruses and replicative immortality—avoiding the telomere hurdle," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 26, pp. 43–51, 2014.
- [9] E. Thomas, V. D. Gonzalez, Q. Li et al., "HCV infection induces a unique hepatic innate immune response associated with robust production of type III interferons," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 4, pp. 978–988, 2012.
- [10] W. Zou and N. P. Restifo, "TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy," *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 4, pp. 248–256, 2010.
- [11] S. Sakaguchi, K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi, "Regulatory T cells: How do they suppress immune responses?" *International Immunology*, vol. 21, no. 10, pp. 1105–1111, 2009.
- [12] A. Busca and A. Kumar, "Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection," *Virology Journal*, vol. 11, no. 1, article 22, 2014.
- [13] J. Pawlotski, "Virus de l'hépatite C et réponse immunitaire," *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, vol. 24, no. 4, p. 123, 2001.
- [14] M. Karin and F. R. Greten, "NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression," *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 10, pp. 749–759, 2005.
- [15] (MIT) satMIoT, "Inflammationcancer link confirmed," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 7, p. 494, 2008.
- [16] B. B. Aggarwal, S. Shishodia, S. K. Sandur, M. K. Pandey, and G. Sethi, "Inflammation and cancer: how hot is the link?" *Biochemical Pharmacology*, vol. 72, no. 11, pp. 1605–1621, 2006.
- [17] J. P. O'Connor, M. B. Manigrasso, B. D. Kim, and S. Subramanian, "Fracture healing and lipid mediators," *BoneKEY Reports*, vol. 3, p. 517, 2014.
- [18] T. Ishida and R. Ueda, "CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer," *Cancer Science*, vol. 97, no. 11, pp. 1139–1146, 2006.
- [19] R. A. Flavell, S. Sanjabi, S. H. Wrzesinski, and P. Licona-Limón, "The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β ," *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 8, pp. 554–567, 2010.
- [20] H. Nishikawa and S. Sakaguchi, "Regulatory T cells in cancer immunotherapy," *Current Opinion in Immunology*, vol. 27, no. 1, pp. 1–7, 2014.
- [21] M. A. Vadas, J. F. A. P. Miller, I. F. C. McKenzie et al., "Ly and Ia antigen phenotypes of T cells involved in delayed type hypersensitivity and in suppression," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 144, no. 1, pp. 10–19, 1976.
- [22] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases," *Journal of Immunology*, vol. 155, no. 3, pp. 1151–1164, 1995.
- [23] S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi, "Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells," *Advances in Immunology*, vol. 81, pp. 331–371, 2003.
- [24] J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi, "Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 2, pp. 135–142, 2002.

- [25] G. A. M. Povoleri, C. Scottá, E. A. Nova-Lamperti, S. John, G. Lombardi, and B. Afzali, "Thymic versus induced regulatory T cells—who regulates the regulators?" *Frontiers in Immunology*, vol. 4, article 169, 2013.
- [26] C. Baecher-Allan, E. Wolf, and D. A. Hafler, "MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 8, pp. 4622–4631, 2006.
- [27] S. Beissert, A. Schwarz, and T. Schwarz, "Regulatory T cells," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 126, no. 1, pp. 15–24, 2006.
- [28] F. Bolacchi, A. Sinistro, C. Ciapriani et al., "Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4⁺ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 144, no. 2, pp. 188–196, 2006.
- [29] S. Deaglio, K. M. Dwyer, W. Gao et al., "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 6, pp. 1257–1265, 2007.
- [30] W. Liu, A. L. Putnam, Z. Xu-yu et al., "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 7, pp. 1701–1711, 2006.
- [31] E. M. Shevach, "Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression," *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 636–645, 2009.
- [32] S. Fabien, M. Olivier, G. Khaldoun et al., "CD49b, a major marker of regulatory T-cells type 1, predicts the response to antiviral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 290878, 9 pages, 2014.
- [33] M. G. Roncarolo, S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings, "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans," *Immunological Reviews*, vol. 212, no. 1, pp. 28–50, 2006.
- [34] Y. Y. Wan and R. A. Flavell, "Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression," *Nature*, vol. 445, no. 7129, pp. 766–770, 2007.
- [35] L. W. Collison, V. Chaturvedi, A. L. Henderson et al., "IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 12, pp. 1093–1101, 2010.
- [36] E. Sato, S. H. Olson, J. Ahn et al., "Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 18538–18543, 2005.
- [37] N. Kobayashi, N. Hiraoka, W. Yamagami et al., "FOXP3⁺ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 3, pp. 902–911, 2007.
- [38] M. Kim, T. Grimmig, M. Grimm et al., "Expression of Foxp3 in colorectal cancer but not in Treg cells correlates with disease progression in patients with colorectal cancer," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e53630, 2013.
- [39] T. L. Whiteside, "Disarming suppressor cells to improve immunotherapy," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 61, no. 2, pp. 283–288, 2012.
- [40] C. C. Chang, R. Ciubotariu, J. S. Manavalan et al., "Tolerization of dendritic cells by T_s cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 3, pp. 237–243, 2002.
- [41] S. Strober, L. Cheng, D. Zeng et al., "Double negative (CD4-CD8- $\alpha\beta$ +) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity," *Immunological Reviews*, no. 149, pp. 217–230, 1996.
- [42] R. A. Peterson, "Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression," *Toxicologic Pathology*, vol. 40, no. 2, pp. 186–204, 2012.
- [43] T. Kushida, M. Inaba, K. Takeuchi, K. Sugiura, R. Ogawa, and S. Ikehara, "Treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice using a new strategy for allogeneic bone marrow transplantation," *Blood*, vol. 95, no. 5, pp. 1862–1868, 2000.
- [44] J. A. Kapp and Y. Ke, "The role of $\gamma\delta$ TCR-bearing T cells in oral tolerance," *Research in Immunology*, vol. 148, no. 8-9, pp. 561–567, 1997.
- [45] F. E. Leal, L. C. Ndhlovu, A. M. Hasenkrug et al., "Expansion in CD39(+) CD4(+) immunoregulatory t cells and rarity of Th17 cells in HTLV-1 infected patients is associated with neurological complications," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 2, Article ID e2028, 2013.
- [46] N. Delhem, F. Cottrez, A. Carpentier et al., "Role of the regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression," *Bulletin du Cancer*, vol. 95, no. 11, pp. 1029–1038, 2008.
- [47] A. Carpentier, F. Conti, M. Carrière et al., "Analysis of gene transcription in sera during chronic hepatitis C infection," *Journal of Medical Virology*, vol. 81, no. 3, pp. 473–480, 2009.
- [48] N. M. Dhafer Mrizak, N. Wambre, L. Ouaguia et al., "Nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes recruit, expand and upregulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 1, p. 18182, 2012.
- [49] D. Camarillo, R. Banerjee, T. L. Greenhow, and J. H. Tureen, "Group B streptococcal endocarditis after elective abortion in an adolescent," *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 28, no. 1, pp. 67–69, 2009.
- [50] N. Hiraoka, K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi, "Prevalence of FOXP3⁺ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions," *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 18, pp. 5423–5434, 2006.
- [51] L. Ouaguia, O. Morales, D. Mrizak et al., "Overexpression of regulatory T cells type 1 (Tr1) specific markers in a patient with HCV-induced hepatocellular carcinoma," *ISRN Hepatology*, vol. 2013, Article ID 928485, 7 pages, 2013.
- [52] N. R. West, S. E. Kost, S. D. Martin et al., "Tumour-infiltrating FOXP3⁺ lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 108, no. 1, pp. 155–162, 2013.
- [53] D. J. Campbell and M. A. Koch, "Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells," *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 2, pp. 119–130, 2011.
- [54] J. M. Llovet, A. Burroughs, and J. Bruix, "Hepatocellular carcinoma," *The Lancet*, vol. 362, no. 9399, pp. 1907–1917, 2003.
- [55] S. F. Altekruse, K. A. McGlynn, and M. E. Reichman, "Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 9, pp. 1485–1491, 2009.
- [56] F. X. Bosch, J. Ribes, M. Díaz, and R. Cléries, "Primary liver cancer: worldwide incidence and trends," *Gastroenterology*, vol. 127, pp. S5–S16, 2004.

- [57] J. M. Llovet and J. Bruix, "Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 48, no. 4, pp. 1312–1327, 2008.
- [58] M. M. Hassan, A. Frome, Y. Z. Patt, and H. B. El-Serag, "Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 35, no. 3, pp. 266–269, 2002.
- [59] G. M. Lauer and B. D. Walker, "Hepatitis C virus infection," *The New England Journal of Medicine*, vol. 345, no. 1, pp. 41–52, 2001.
- [60] Y. Hoshida, A. Villanueva, M. Kobayashi et al., "Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 19, pp. 1995–2004, 2008.
- [61] A. Fournillier-Jacob, M. Girard, and C. Wychowski, "Infection par le virus de l'hépatite C et réponse immunitaire: application au diagnostic et à la vaccination," *Virologie*, vol. 1, no. 3, pp. 217–228, 1997.
- [62] P. A. Knolle and R. Thimme, "Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection," *Gastroenterology*, vol. 146, no. 5, pp. 1193–1207, 2014.
- [63] W. Wu, J. Li, F. Chen, H. Zhu, G. Peng, and Z. Chen, "Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 25, no. 4, pp. 750–757, 2010.
- [64] J.-P. Zhang, J. Yan, J. Xu et al., "Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients," *Journal of Hepatology*, vol. 50, no. 5, pp. 980–989, 2009.
- [65] M. Numasaki, J.-I. Fukushi, M. Ono et al., "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth," *Blood*, vol. 101, no. 7, pp. 2620–2627, 2003.
- [66] I. Kryczek, S. Wei, L. Zou et al., "Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 11, pp. 6730–6733, 2007.
- [67] J. Yang, J.-X. Zhang, H. Wang, G.-L. Wang, Q.-G. Hu, and Q.-C. Zheng, "Hepatocellular carcinoma and macrophage interaction induced tumor immunosuppression via treg requires TLR4 signaling," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 18, no. 23, pp. 2938–2947, 2012.
- [68] J.-I. Riezu-Boj, E. Larrea, R. Aldabe et al., "Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection," *Journal of Hepatology*, vol. 54, no. 3, pp. 422–431, 2011.
- [69] A. Budhu and X. W. Wang, "The role of cytokines in hepatocellular carcinoma," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 80, no. 6, pp. 1197–1213, 2006.
- [70] A. R. Lopes, P. Kellam, A. Das et al., "Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8+ T cells in patients unable to control HBV infection," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 5, pp. 1835–1845, 2008.
- [71] J. Haybaeck, N. Zeller, M. J. Wolf et al., "A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma," *Cancer Cell*, vol. 16, no. 4, pp. 295–308, 2009.
- [72] M. S. N. Ramzan, M. A. Thélou, C. Guillermet et al., "Intrahepatic lymphocytes in HCV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma," *Gut*, 2012.
- [73] H. Ito, M. Hoshi, H. Ohtaki et al., "Ability of IDO to attenuate liver injury in α -galactosylceramide-induced hepatitis model," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 8, pp. 4554–4560, 2010.
- [74] A. Das, M. Hoare, N. Davies et al., "Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 9, pp. 2111–2124, 2008.
- [75] S. Cooper, A. L. Erickson, E. J. Adams et al., "Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus," *Immunity*, vol. 10, no. 4, pp. 439–449, 1999.
- [76] P. Knolle, J. Schlaak, A. Uhrig, P. Kempf, K.-H. Meyer zum Buschenfelde, and G. Gerken, "Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge," *Journal of Hepatology*, vol. 22, no. 2, pp. 226–229, 1995.
- [77] B. Bengsch, B. Seigel, M. Ruhl et al., "Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation," *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 6, 2010.
- [78] M. M. Lai and C. F. Ware, "Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 242, pp. 117–134, 2000.
- [79] D. J. Kittlesen, K. A. Chianese-Bullock, Z. Q. Yao, T. J. Braciale, and Y. S. Hahn, "Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no. 10, pp. 1239–1249, 2000.
- [80] G. Gong, G. Waris, R. Tanveer, and A. Siddiqui, "Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 17, pp. 9599–9604, 2001.
- [81] N. Pavio, P. R. Romano, T. M. Graczyk, S. M. Feinstone, and D. R. Taylor, "Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2 α kinase PERK," *Journal of Virology*, vol. 77, no. 6, pp. 3578–3585, 2003.
- [82] M. A. Sarhan, A. Y. Chen, and T. I. Michalak, "Differential expression of candidate virus receptors in human T lymphocytes prone or resistant to infection with patient-derived hepatitis C virus," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, Article ID e62159, 2013.
- [83] N. Kakita, T. Kanto, I. Itose et al., "Comparative analyses of regulatory T cell subsets in patients with hepatocellular carcinoma: a crucial role of CD25⁻FOXP3⁺ T cells," *International Journal of Cancer*, vol. 131, no. 11, pp. 2573–2583, 2012.
- [84] J. Fu, D. Xu, Z. Liu et al., "Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 7, pp. 2328–2339, 2007.
- [85] E. Unitt, S. M. Rushbrook, A. Marshall et al., "Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells," *Hepatology*, vol. 41, no. 4, pp. 722–730, 2005.
- [86] Y. Yi, H.-W. He, J.-X. Wang et al., "The functional impairment of HCC-infiltrating $\gamma\delta$ T cells, partially mediated by regulatory T cells in a TGF β - and IL-10-dependent manner," *Journal of Hepatology*, vol. 58, no. 5, pp. 977–983, 2013.
- [87] S. M. Rushbrook, S. M. Ward, E. Unitt et al., "Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7852–7859, 2005.
- [88] D. Accapezzato, V. Francavilla, M. Paroli et al., "Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, pp. 963–972, 2004.
- [89] A. J. MacDonald, M. Duffy, M. T. Brady et al., "CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes

- on the core protein in hepatitis C virus-infected persons," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 185, no. 6, pp. 720–727, 2002.
- [90] J. H. Wang, M. J. Pianko, X. Ke et al., "Characterization of antigenic variants of hepatitis C virus in immune evasion," *Virology Journal*, vol. 8, article 377, 2011.
- [91] X. J. Ji, C. J. Ma, J. M. Wang et al., "HCV-infected hepatocytes drive CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T-cell development through the Tim-3/Gal-9 pathway," *European Journal of Immunology*, vol. 43, no. 2, pp. 458–467, 2013.
- [92] C. H. T. Hall, R. Kassel, R. S. Tacke, and Y. S. Hahn, "HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4⁺ T cells through the production of TGF- β ," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 8, Article ID e12154, 2010.
- [93] E. Billerbeck, H. E. Blum, and R. Thimme, "Parallel expansion of human virus-specific FoxP3- effector memory and de novo-generated FoxP3⁺ regulatory CD8⁺ T cells upon antigen recognition in vitro," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 2, pp. 1039–1048, 2007.
- [94] M. Abel, D. S ene, S. Pol et al., "Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection," *Hepatology*, vol. 44, no. 6, pp. 1607–1616, 2006.
- [95] K. Takatsuki, "Adult T-cell leukemia/lymphoma," *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, vol. 74, no. 9, pp. 1210–1213, 1985.
- [96] G. de The and R. Bomford, "An HTLV-I vaccine: why, how, for whom?" *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 9, no. 5, pp. 381–386, 1993.
- [97] H. Matsuzaki, K. Yamaguchi, T. Kagimoto, R. Nakai, K. Takatsuki, and W. Oyama, "Monoclonal gammopathies in adult T-cell leukemia," *Cancer*, vol. 56, pp. 1380–1383, 1985.
- [98] K. Nakada, K. Yamaguchi, S. Furugen et al., "Monoclonal integration of HTLV-I proviral DNA in patients with strongyloidiasis," *International Journal of Cancer*, vol. 40, no. 2, pp. 145–148, 1987.
- [99] S. Y. Lee, K. Mastushita, J. Machida, M. Tajiri, K. Yamaguchi, and K. Takatsuki, "Human T-cell leukemia virus type I infection in hemodialysis patients," *Cancer*, vol. 60, no. 7, pp. 1474–1478, 1987.
- [100] K. Ohshima, "Pathological features of diseases associated with human T-cell leukemia virus type I," *Cancer Science*, vol. 98, no. 6, pp. 772–778, 2007.
- [101] K.-I. Ohshima, M. Kikuchi, T. Yoshida, Y.-I. Masuda, and N. Kimura, "Lymph nodes in incipient adult T-cell leukemia-lymphoma with Hodgkin's disease-like histologic features," *Cancer*, vol. 67, no. 6, pp. 1622–1628, 1991.
- [102] Y. Yamano, N. Araya, T. Sato et al., "Abnormally high levels of virus-infected IFN- γ ⁺CCR4⁺CD4⁺CD25⁺ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 8, Article ID e6517, 2009.
- [103] Y. Satou, A. Utsunomiya, J. Tanabe, M. Nakagawa, K. Nosaka, and M. Matsuoka, "HTLV-I modulates the frequency and phenotype of FoxP3⁺CD4⁺ T cells in virus-infected individuals," *Retrovirology*, vol. 9, article 46, 2012.
- [104] K. Tsukasaki, C. W. Miller, T. Kubota et al., "Tumor necrosis factor α polymorphism associated with increased susceptibility to development of adult T-cell leukemia/lymphoma in human T-lymphotropic virus type I carriers," *Cancer Research*, vol. 61, no. 9, pp. 3770–3774, 2001.
- [105] J. K. Chan and W. C. Greene, "Dynamic roles for NF- κ B in HTLV-I and HIV-1 retroviral pathogenesis," *Immunological Reviews*, vol. 246, no. 1, pp. 286–310, 2012.
- [106] D. W. Ballard, "Molecular mechanisms in lymphocyte activation and growth," *Immunologic Research*, vol. 23, no. 2-3, pp. 157–166, 2001.
- [107] T. A. Waldmann, S. Dubois, and Y. Tagaya, "Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy," *Immunity*, vol. 14, no. 2, pp. 105–110, 2001.
- [108] P. Wattré, V. Bert, and D. Hober, "Apoptosis and human viral infections," *Annales de Biologie Clinique*, vol. 54, pp. 189–197, 1996.
- [109] M. Abe, K. Uchihashi, T. Kazuto et al., "Foxp3 expression on normal and leukemic CD4⁺CD25⁺ T cells implicated in human T-cell leukemia virus type-1 is inconsistent with Treg cells," *European Journal of Haematology*, vol. 81, no. 3, pp. 209–217, 2008.
- [110] G. Roncador, J. F. Garcia, L. Maestre et al., "FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma," *Leukemia*, vol. 19, no. 12, pp. 2247–2253, 2005.
- [111] T. Kohno, Y. Yamada, N. Akamatsu et al., "Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T-lymphotropic virus type-1-infected regulatory T cells," *Cancer Science*, vol. 96, no. 8, pp. 527–533, 2005.
- [112] Y. Yamano, C. J. Cohen, N. Takenouchi et al., "Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A*201 complexes on CD4⁺CD25⁺ T cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 199, no. 10, pp. 1367–1377, 2004.
- [113] Y. Yamano, N. Takenouchi, H.-C. Li et al., "Virus-induced dysfunction of CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 5, pp. 1361–1368, 2005.
- [114] C. L. Tendler, S. J. Greenberg, J. D. Burton et al., "Cytokine induction in HTLV-I associated myelopathy and adult T-cell leukemia: alternate molecular mechanisms underlying retroviral pathogenesis," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 46, no. 4, pp. 302–311, 1991.
- [115] E. Ramirez, L. Cartier, L. Rodriguez, C. Alberti, and M. A. Valenzuela, "In vivo fluctuation of Tax, Foxp3, CTLA-4, and GITR mRNA expression in CD4(+)CD25(+) T cells of patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 43, no. 11, pp. 1109–1115, 2010.
- [116] T. Shimauchi, K. Kabashima, and Y. Tokura, "Adult T-cell leukemia/lymphoma cells from blood and skin tumors express cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 and Foxp3 but lack suppressor activity toward autologous CD8⁺ T cells," *Cancer Science*, vol. 99, no. 1, pp. 98–106, 2008.
- [117] M. Miyara, Y. Yoshioka, A. Kitoh et al., "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor," *Immunity*, vol. 30, no. 6, pp. 899–911, 2009.
- [118] P. Miyazato and M. Matsuoka, "Human T-cell leukemia virus type 1 and Foxp3 expression: viral strategy *in vivo*," *International Immunology*, vol. 26, no. 8, pp. 419–425, 2014.
- [119] Z. Shenghui, H. Yixiang, W. Jianbo et al., "Elevated frequencies of CD4⁺CD25⁺CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia," *International Journal of Cancer*, vol. 129, no. 6, pp. 1373–1381, 2011.
- [120] L.-F. Lu, T.-H. Thai, D. P. Calado et al., "Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells

- by targeting SOCS1 protein," *Immunity*, vol. 30, no. 1, pp. 80–91, 2009.
- [121] I. Faraoni, F. R. Antonetti, J. Cardone, and E. Bonmassar, "miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1792, no. 6, pp. 497–505, 2009.
- [122] F. Toulza, K. Nosaka, Y. Tanaka et al., "Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3+ regulatory T cells," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 1, pp. 183–189, 2010.
- [123] M. A. C. de Lafaille and J. J. Lafaille, "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 626–635, 2009.
- [124] S. B. Patrie and P. J. Farrell, "The role of Epstein-Barr virus in cancer," *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 6, no. 11, pp. 1193–1205, 2006.
- [125] H. Kanegane, K. Nomura, T. Miyawaki, and G. Tosato, "Biological aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 44, no. 3, pp. 239–249, 2002.
- [126] H. Knecht, C. Berger, S. Rothenberger, B. F. Odermatt, and P. Brousset, "The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation," *Oncology*, vol. 60, no. 4, pp. 289–302, 2001.
- [127] C. A. Kelleher, D. H. Dreyfus, J. F. Jones, and E. W. Gelfand, "EBV infection of T cells: potential role in malignant transformation," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 7, no. 4, pp. 197–207, 1996.
- [128] L. S. Young and A. B. Rickinson, "Epstein-Barr virus: 40 Years on," *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 10, pp. 757–768, 2004.
- [129] E. Grywalska, J. Markowicz, P. Grabarczyk, M. Pasiarski, and J. Roliński, "Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders," *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, vol. 67, pp. 481–490, 2013.
- [130] F. Bray, M. Haugen, T. A. Moger, S. Tretli, O. O. Aalen, and T. Grotmol, "Age-incidence curves of nasopharyngeal carcinoma worldwide: bimodality in low-risk populations and aetiological implications," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 17, no. 9, pp. 2356–2365, 2008.
- [131] A. T. C. Chan, "Nasopharyngeal carcinoma," *Annals of Oncology*, vol. 21, supplement 7, pp. vii308–vii312, 2010.
- [132] Y.-Y. Yap, S. Hassan, M. Chan, P. K. Choo, and M. Ravichandran, "Epstein-Barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma," *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, vol. 136, no. 6, pp. 986–991, 2007.
- [133] D. Liebowitz, "Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein-Barr virus association," *Seminars in Oncology*, vol. 21, no. 3, pp. 376–381, 1994.
- [134] S.-J. Lu, N. E. Day, L. Degos et al., "Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region," *Nature*, vol. 346, no. 6283, pp. 470–471, 1990.
- [135] X. Zheng, L. Yan, B. Nilsson, G. Eklund, and B. Drettner, "Epstein-Barr virus infection, salted fish and nasopharyngeal carcinoma. A case-control study in Southern China," *Acta Oncologica*, vol. 33, no. 8, pp. 867–872, 1994.
- [136] L. Gallicchio, G. Matanoski, X. Tao et al., "Adulthood consumption of preserved and nonpreserved vegetables and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a systematic review," *International Journal of Cancer*, vol. 119, no. 5, pp. 1125–1135, 2006.
- [137] A. Hildesheim and C. P. Wang, "Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: a review of epidemiological association studies, 2000–2011. Rosetta Stone for NPC: genetics, viral infection, and other environmental factors," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 22, no. 2, pp. 107–116, 2012.
- [138] P. G. Knox, Q.-X. Li, A. B. Rickinson, and L. S. Young, "In vitro production of stable Epstein-Barr virus-positive epithelial cell clones which resemble the virus: cell interaction observed in nasopharyngeal carcinoma," *Virology*, vol. 215, no. 1, pp. 40–50, 1996.
- [139] G. Niedobitek, L. S. Young, C. K. Sam, L. Brooks, U. Prasad, and A. B. Rickinson, "Expression of Epstein-Barr virus genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas," *The American Journal of Pathology*, vol. 140, no. 4, pp. 879–887, 1992.
- [140] R. Pathmanathan, U. Prasad, R. Sadler, K. Flynn, and N. Raab-Traub, "Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 11, pp. 693–698, 1995.
- [141] S. Depil, O. Moralès, and C. Aurialt, "Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus," *Annales de Biologie Clinique*, vol. 62, no. 6, pp. 639–648, 2004.
- [142] R. F. Jarrett, G. L. Stark, J. White et al., "Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study," *Blood*, vol. 106, no. 7, pp. 2444–2451, 2005.
- [143] P. Busson, K. Braham, G. Ganem et al., "Epstein-Barr virus-containing epithelial cells from nasopharyngeal carcinoma produce interleukin 1 alpha," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 17, pp. 6262–6266, 1987.
- [144] Y.-T. Huang, T.-S. Sheen, C.-L. Chen et al., "Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4+ T cells," *Cancer Research*, vol. 59, no. 7, pp. 1599–1605, 1999.
- [145] K. F. Tang, S. Y. Tan, S. H. Chan et al., "A distinct expression of CC chemokines by macrophages in nasopharyngeal carcinoma: Implication for the intense tumor infiltration by T lymphocytes and macrophages," *Human Pathology*, vol. 32, no. 1, pp. 42–49, 2001.
- [146] M. Teichmann, B. Meyer, A. Beck, and G. Niedobitek, "Expression of the interferon-inducible chemokine IP-10 (CXCL10), a chemokine with proposed anti-neoplastic functions, in Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma," *The Journal of Pathology*, vol. 206, no. 1, pp. 68–75, 2005.
- [147] P. Herait, G. Ganem, M. Lipinski et al., "Lymphocyte subsets in tumour of patients with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: presence of lymphocytes with the phenotype of activated T cells," *The British Journal of Cancer*, vol. 55, no. 2, pp. 135–139, 1987.
- [148] A. Agathangelou, G. Niedobitek, R. Chen, J. Nicholls, W. Yin, and L. S. Young, "Expression of immune regulatory molecules in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas with prominent lymphoid stroma evidence for a functional interaction between epithelial tumor cells and infiltrating lymphoid cells," *The American Journal of Pathology*, vol. 147, no. 4, pp. 1152–1160, 1995.
- [149] L. Ferradini, S. Miescher, M. Stoeck et al., "Cytotoxic potential despite impaired activation pathways in T lymphocytes infiltrating nasopharyngeal carcinoma," *International Journal of Cancer*, vol. 47, no. 3, pp. 362–370, 1991.
- [150] Y. S. Zong, C. Q. Zhang, F. Zhang et al., "Infiltrating lymphocytes and accessory cells in nasopharyngeal carcinoma,"

- Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 84, no. 8, pp. 900–905, 1993.
- [151] A. Giannini, S. Bianchi, L. Messerini et al., “Prognostic significance of accessory cells and lymphocytes in nasopharyngeal carcinoma,” *Pathology Research and Practice*, vol. 187, no. 4, pp. 496–502, 1991.
- [152] C.-M. Liu, J.-J. Ko, C.-T. Shun, T.-Y. Hsiao, and T.-S. Sheen, “Soluble adhesion molecules and cytokines in tumor-associated tissue eosinophilia of nasopharyngeal carcinoma,” *Acta Otolaryngologica*, vol. 121, no. 4, pp. 534–538, 2001.
- [153] L.-C. Chen, L.-J. Wang, N.-M. Tsang et al., “Tumour inflammasome-derived IL-1 β recruits neutrophils and improves local recurrence-free survival in EBV-induced nasopharyngeal carcinoma,” *EMBO Molecular Medicine*, vol. 4, no. 12, pp. 1276–1293, 2012.
- [154] H. Hu, K. F. Tang, Y. N. Chua et al., “Expression of interleukin-18 by nasopharyngeal carcinoma cells: a factor that possibly initiates the massive leukocyte infiltration,” *Human Pathology*, vol. 35, no. 6, pp. 722–728, 2004.
- [155] M. Samoszuk and L. Nansen, “Detection of interleukin-5 messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin’s disease with eosinophilia,” *Blood*, vol. 75, no. 1, pp. 13–16, 1990.
- [156] H. Hanamoto, T. Nakayama, H. Miyazato et al., “Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin’s disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells,” *The American Journal of Pathology*, vol. 164, no. 3, pp. 997–1006, 2004.
- [157] F. Jundt, I. Anagnostopoulos, K. Bommert et al., “Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils,” *Blood*, vol. 94, no. 6, pp. 2065–2071, 1999.
- [158] H. D. Foss, H. Herbst, E. Oelmann et al., “Lymphotoxin, tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcripts are present in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of most Hodgkin’s disease cases,” *British Journal of Haematology*, vol. 84, no. 4, pp. 627–635, 1993.
- [159] O. Micheau and J. Tschopp, “Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes,” *Cell*, vol. 114, no. 2, pp. 181–190, 2003.
- [160] B. C. Barnhart and M. E. Peter, “The TNF receptor I: a split personality complex,” *Cell*, vol. 114, no. 2, pp. 148–150, 2003.
- [161] M. Hinz, P. Lemke, I. Anagnostopoulos et al., “Nuclear factor κ b-dependent gene expression profiling of Hodgkin’s disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, no. 5, pp. 605–617, 2002.
- [162] H.-D. Foss, M. Hummel, S. Gottstein et al., “Frequent expression of IL-7 gene transcripts in tumor cells of classical Hodgkin’s disease,” *The American Journal of Pathology*, vol. 146, no. 1, pp. 33–39, 1995.
- [163] M. Jucker, H. Abts, D. Eick, G. M. Lenoir, and H. Tesch, “Overexpression of lck in Burkitt’s lymphoma cell lines,” *Leukemia*, vol. 5, no. 6, pp. 528–530, 1991.
- [164] M. Malec, M. Söderqvist, A. Sirsjö et al., “Real-time polymerase chain reaction determination of cytokine mRNA expression profiles in Hodgkin’s lymphoma,” *Haematologica*, vol. 89, no. 6, pp. 679–685, 2004.
- [165] U. Kapp, W. C. Yeh, B. Patterson et al., “Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 189, no. 12, pp. 1939–1946, 1999.
- [166] K. Ohshima, M. Akaiwa, R. Umeshita, J. Suzumiya, K. Izuhara, and M. Kikuchi, “Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin’s disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis,” *Histopathology*, vol. 38, no. 4, pp. 368–375, 2001.
- [167] B. F. Skinnider and T. W. Mak, “The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma,” *Blood*, vol. 99, no. 12, pp. 4283–4297, 2002.
- [168] E. Maggio, A. van den Berg, A. Diepstra, J. Kluiver, L. Visser, and S. Poppema, “Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin’s lymphoma cell lines and tissues,” *Annals of Oncology*, vol. 13, supplement 1, pp. 52–56, 2002.
- [169] U. E. Höpken, H.-D. Foss, D. Meyer et al., “Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs,” *Blood*, vol. 99, no. 4, pp. 1109–1116, 2002.
- [170] J. Schwaller, A. Tobler, G. Niklaus et al., “Interleukin-12 expression in human lymphomas and nonneoplastic lymphoid disorders,” *Blood*, vol. 85, no. 8, pp. 2182–2188, 1995.
- [171] A. van Den Berg, E. Maggio, R. Rust, K. Kooistra, A. Diepstra, and S. Poppema, “Clonal relation in a case of CLL, ALCL, and Hodgkin composite lymphoma,” *Blood*, vol. 100, no. 4, pp. 1425–1429, 2002.
- [172] M. Yao, K. Ohshima, J. Suzumiya, T. Kume, T. Shiroshita, and M. Kikuchi, “Interleukin-10 expression and cytotoxic-T-cell response in Epstein-Barr-virus-associated nasopharyngeal carcinoma,” *International Journal of Cancer*, vol. 72, pp. 398–402, 1997.
- [173] S. Fujieda, K. Lee, H. Sunaga et al., “Staining of interleukin-10 predicts clinical outcome in patients with nasopharyngeal carcinoma,” *Cancer*, vol. 85, no. 7, pp. 1439–1445, 1999.
- [174] E. Özyar, A. Ayhan, A. F. Korcum, and I. L. Atahan, “Prognostic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and Interleukin-10 expression in patients with nasopharyngeal carcinoma,” *Cancer Investigation*, vol. 22, no. 4, pp. 483–491, 2004.
- [175] A. Beck, D. Pzolt, G. G. Grabenbauer et al., “Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin’s disease,” *The Journal of Pathology*, vol. 194, no. 2, pp. 145–151, 2001.
- [176] K.-M. Lau, S. H. Cheng, K. W. Lo et al., “Increase in circulating Foxp3 + CD4 + CD25^{high} regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients,” *British Journal of Cancer*, vol. 96, no. 4, pp. 617–622, 2007.
- [177] N. A. Marshall, L. E. Christie, L. R. Munro et al., “Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma,” *Blood*, vol. 103, no. 5, pp. 1755–1762, 2004.
- [178] C.-T. Huang, C. J. Workman, D. Flies et al., “Role of LAG-3 in regulatory T cells,” *Immunity*, vol. 21, no. 4, pp. 503–513, 2004.
- [179] M. K. Gandhi, E. Lambley, J. Duraiswamy et al., “Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8⁺ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients,” *Blood*, vol. 108, no. 7, pp. 2280–2289, 2006.
- [180] S. V. Kui, G. Peng, Z. Guo et al., “Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4⁺ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation,” *Cancer Research*, vol. 65, no. 4, pp. 1577–1586, 2005.
- [181] D. F. Dukers, P. Meij, M. B. H. J. Vervoort et al., “Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1,” *Journal of Immunology*, vol. 165, no. 2, pp. 663–670, 2000.

- [182] K.-P. Chang, S.-P. Hao, J.-H. Chang et al., "Macrophage inflammatory protein-3 α is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 21, pp. 6979–6987, 2008.
- [183] A. L. Chapman, A. B. Rickinson, W. A. Thomas, R. F. Jarrett, J. Crocker, and S. P. Lee, "Epstein-barr virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in the blood and tumor site of Hodgkin's disease patients: implications for a T-cell-based therapy," *Cancer Research*, vol. 61, no. 16, pp. 6219–6226, 2001.
- [184] S. Poppema, M. Potters, R. Emmens, L. Visser, and A. van den Berg, "Immune reactions in classical Hodgkin's lymphoma," *Seminars in Hematology*, vol. 36, no. 3, pp. 253–259, 1999.
- [185] T. J. Curiel, G. Coukos, L. Zou et al., "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 9, pp. 942–949, 2004.
- [186] J. D. Fontenot, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky, "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells," *Nature Immunology*, vol. 4, no. 4, pp. 330–336, 2003.
- [187] W.-Z. Wei, G. P. Morris, and Y.-C. M. Kong, "Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 53, no. 2, pp. 73–78, 2004.
- [188] S. Baráth, M. Aleksza, K. Keresztes et al., "Immunoregulatory T cells in the peripheral blood of patients with Hodgkin's lymphoma," *Acta Haematologica*, vol. 116, no. 3, pp. 181–185, 2006.
- [189] T. Alvaro, M. Lejeune, M. T. Salvado et al., "Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, pp. 1467–1473, 2005.
- [190] O. Morales, D. Mrizak, V. François et al., "Epstein-Barr virus infection induces an increase of T regulatory type 1 cells in Hodgkin lymphoma patients," *British Journal of Haematology*, vol. 166, no. 6, pp. 875–890, 2014.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>



ARTICLE 6

Le CD49b, Marqueurs Majeur des Lymphocytes T Régulateurs de Type 1 prédit la réponse aux thérapies Antivirales et La récurrence de l'Hépatite C après transplantation hépatique.

CD49b, a Major Marker of Regulatory T-Cells Type 1, Predicts the Response to Antiviral Therapy of Recurrent Hepatitis C after Liver Transplantation

BioMed Research International, volume 2014, Article ID 290878, 9 pages

Fabien Stenard, Olivier Morales, Khaldoun Ghazal, Vivian Viallon, Lynda Aoudjehane, **Laurissa Ouaguia**, Gautier Goormachtigh, Yvon Calmus, Filomena Conti et Nadira Delhem

Mots clés : Tr1, CD49b, HCV, TRANSPEG

Résumé : La cirrhose consécutive à une infection par le virus de l'hépatite C est une des principales indications de la transplantation hépatique (TH). Des études ont montré que les cellules effectrices T helper 1 (Th1) et les CTL (cytotoxic T lymphocytes) étaient impliqués dans le développement des lésions hépatiques médiées par le VHC. Par ailleurs, la réinfection virale C du greffon après TH serait universelle et les lésions du greffon évoluent de façon accélérée conduisant à la (i) cirrhose chez 30% des patients dans les cinq ans et à la (ii) survie réduite des patients comparés aux autres indications. Cependant, les mécanismes responsables de l'accélération des lésions hépatiques induites par le VHC après TH restent encore mal compris. De nombreuses études ont montré que la clairance virale pourrait être associée à des réponses CD4+ et CD8+ antivirales persistantes, mais la défaillance de ces réponses conduirait à l'évolution de la maladie vers la chronicité. Récemment, une attention particulière a été portée sur la contribution des lymphocytes T régulateurs dans le passage à la chronicité. Ces travaux ont montré que les Treg sont capables d'inhiber la réponse immune anti-virale et anti-tumorale, d'inhiber le développement des maladies auto-immunes et de favoriser la tolérance des greffons. Ainsi, certains pathogènes comme le VHC pourrait exploiter les Treg afin de créer un environnement immunologique favorable pour échapper à la réponse immunitaire. On distingue 2 grandes familles de Treg : les Treg naturels caractérisés par l'expression du CD25, GITR, FOXP3 et les Treg induits qui sont subdivisés en différentes sous-populations et dont les plus connus sont les lymphocytes T régulateurs induits de type 1 caractérisés par l'expression des marqueurs CD138 et CD49b et par la sécrétion de l'IL-10. Des études ont décrit la présence concomitante des cellules Tr1 IL10+ et Th1 IFN γ + dans la circulation des patients chroniquement infectés par le VHC, suggérant ainsi que ces 2 populations reconnaissent les mêmes épitopes viraux. Ceci suggère que les cellules Tr1 pourraient également être impliquées dans la pathogenèse du VHC. Notre équipe a déjà évalué l'expression et l'activité des Treg, ainsi que leur possible implication dans la progression accélérée de la récurrence du VHC après TH et les résultats montraient que les Tr1 étaient très abondants chez les patients développant une récurrence sévère. Dans cette étude, nous avons continué les travaux en analysant la corrélation potentielle entre la fréquence des Tr1 et la réponse antivirale après transplantation hépatique.

Matériels et méthodes : Nous avons travaillé sur une cohorte de 27 patients inclus dans l'étude TRANSPEG qui est une étude prospective et multicentrique, comparant si le « bras » des patients traités, pendant 52 semaines avec une bithérapie combinant la ribavirine+interféron-2a suivi de 52 semaines de monothérapie de ribavirine, procurait un bénéfice additionnel dans la récurrence de l'infection virale C comparés aux patients contrôle (52 semaines de bithérapie +52 semaines de placebo). Les niveaux de Tr1 ont été évalués par PCR quantitative en temps réel par la recherche du marqueur CD49b dans les séras, dans les PBMC et dans les biopsies de chaque patient.

Par ailleurs, la présence des cytokines immunosuppressives (IL-10) et pro-inflammatoires (IFN γ) a été analysée par cytométrie.

Résultats et discussion : Les résultats antérieurs de l'équipe avaient montré que la fréquence des Treg était significativement augmentée dans la récurrence de l'hépatite C, et que les cellules Tr1 étaient spécifiquement augmentées dans les formes sévères. De plus, les taux sériques d'IL-10, caractéristique du sous-type Tr1, semblaient augmentés chez les patients ayant une récurrence sévère, comparés aux patients ayant une récurrence modérée du VHC et pouvaient donc être prédictifs de l'évolution de la récurrence. Dans la présente étude, les résultats montrent, pour la première fois, que les niveaux de Tr1 dans le sérum, dans les PBMC ou dans le foie de patients avant le traitement anti-viral sont très faibles, en particulier chez les patients qui développeront une réponse virologique soutenue (SVR). Tandis que les patients qui ne développeront pas une SVR, semblent posséder des taux plus élevés de Tr1. De plus, nos résultats ont montré que l'expression relative du CD49b pouvait prédire la SVR aux traitements dans l'étude TRANSPEG. Ainsi, les Tr1CD49b+ pourraient jouer un rôle important dans la défaillance de la réponse immunitaire au cours de l'hépatite C, ainsi qu'au cours de la récurrence virale après transplantation hépatique. Ces Tr1 pourraient aussi participer à l'échec des traitements anti-viraux et servir de marqueur prédictif à la réponse aux traitements.

Conclusion : La mise en évidence d'une expression sérique, cellulaire et tissulaire du marqueur CD49b semble être un facteur prédictif de la réponse au traitement. Ce nouvel outil pourrait être utile dans la sélection des patients transplantés hépatiques qui auraient besoin d'un traitement antiviral plus précoce et plus efficace.

Research Article

CD49b, a Major Marker of Regulatory T-Cells Type 1, Predicts the Response to Antiviral Therapy of Recurrent Hepatitis C after Liver Transplantation

Stenard Fabien,^{1,2} Morales Olivier,³ Ghazal Khaldoun,² Viallon Vivian,⁴
Aoudjehane Lynda,² Ouaguia Laurissa,³ Goormachtigh Gautier,³ Calmus Yvon,^{1,2}
Delhem Nadira,³ and Conti Filomena^{1,2}

¹ Centre de Transplantation Hépatique, Pôle Digestif, APHP, Hôpital Saint Antoine, 184 Rue de Faubourg Saint Antoine, 75012 Paris, France

² UPMC Université Paris 6, Inserm, UMR_S938, Centre de Recherche Saint Antoine, 75012 Paris, France

³ UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, 59028 Lille, France

⁴ Unité de Biostatistique, Hôpital Cochin, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Correspondence should be addressed to Delhem Nadira; nadira.delhem@ibl.fr and Conti Filomena; filomena.conti@sat.aphp.fr

Received 30 April 2013; Revised 8 October 2013; Accepted 14 October 2013; Published 19 January 2014

Academic Editor: Kenichi Harada

Copyright © 2014 Stenard Fabien et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The TRANSPREG study was a prospective study to assess the efficacy of antiviral therapy in patients with a recurrent hepatitis C virus (HCV) after liver transplantation. The influence of regulatory T-cells (Tregs) on the response to antiviral therapy was analyzed. Patients were considered as a function of their sustained virological response (SVR) at 18 months after treatment initiation. A transcriptomic analysis was performed to assess Treg markers (Tr1 and FoxP3⁺) in serum, PBMC, and liver biopsies. 100 patients had been included in the TRANSPREG study. Data from 27 of these patients were available. The results showed that the expression of CD49b (a predominant marker of Tr1) before the introduction of antiviral therapy was significantly associated with SVR. Responders displayed lower serum levels of CD49b than nonresponders ($P < 0.02$). These findings were confirmed in PBMC and liver biopsies even if in a nonsignificant manner for the limited number of samples. The assessment of CD49b levels is thus predictive of the response to antiviral therapy. This data suggests that CD49b may be a marker of the failure of the immune response and antiviral therapy during HCV recurrence. The assessment of CD49b could help to select patients who require earlier and more intensive antiviral therapy.

1. Introduction

Cirrhosis due to hepatitis C virus (HCV) is becoming the main indication for liver transplantation (LT). Cumulative studies have revealed that HCV is not directly cytopathic to hepatocytes [1]. It has been demonstrated that T helper-1 lymphocyte (Th1) or cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses are critically involved in HCV-mediated liver injury [2]. HCV infection of the graft is universal, and graft damage is often accelerated, leading to cirrhosis in 30% of patients within five years [3], and reduced patient survival compared to other indications [4, 5]. The mechanisms of accelerated HCV-induced liver damage after LT are poorly understood.

Viral clearance seems to be associated with persistent CD4⁺ and CD8⁺ antiviral responses [6]. Strong Th1 activity, specific to Core, NS3, NS4, and NS5 proteins, is associated with spontaneous recovery [7], whereas a weak or non-persistent CD4 response is associated with a poor outcome [8]. The role of CD8⁺ T cells during acute infection has been clearly demonstrated [9]. Much attention has recently focused on regulatory T-cells (Tregs) and their contribution to HCV disease. The classic CD25⁺ Treg population, which accounts for 5–10% of peripheral CD4⁺ T-cells, constitutively expresses CD25 [10] and can suppress host immune responses in the setting of autoimmune diseases, transplantation, and antitumour immunity [11, 12]. Treg also constitutively

expresses surface markers such as the glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related Gene, GITR (CD133) [13], cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 CTLA4 (CD152) [14], and the transcription factor Foxp3, which is characteristic of this subpopulation [15]. Other subpopulations of regulatory T-cell subsets, such as IL-10-secreting Tr1 cells that express CD18 and CD49b [16, 17], and TGF- β -secreting Th3 cells [18] have also been described.

There is some evidence to suggest that pathogens can exploit Treg to create a favourable immunological environment in order to escape an adequate immune response. In chronic HCV infection, the activation of virus-specific T-cells may be suppressed by CD4⁺CD25⁺ Treg, which might contribute to the inadequate immune response to HCV. An increased frequency of CD4⁺CD25⁺ T cells was recently found in the blood of patients with persistent HCV infection, compared with those who had cleared HCV [19, 20]. The *in vitro* depletion of CD25⁺ T-cells results in increased HCV-specific T-cell responsiveness. It has been proposed that CD4⁺CD25⁺ cells contribute to HCV persistence by suppressing HCV-specific T-cell responses [21, 22]. Some studies have also shown a correlation between a reduced HCV-specific T-cell response and the secretion of TGF- β by liver-infiltrating CD4⁺CD25⁺ T-cells [19], and regulatory T-cells are able to inhibit HCV-specific T-cell activity, independently of IL-10 and TGF- β [20, 21]. However, it has also been shown that functional Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Tregs are detectable during both persistent HCV infection and after recovery, suggesting that they are part of the normal immune response to this pathogen [22]. In chronically infected patients, IL-10 secreting Tr1 cells circulate concomitantly with interferon (IFN) γ -secreting Th1 cells, and these two subtypes of CD4 T-cells recognize the same epitopes on HCV core protein [23], suggesting that Tr1 cells may also be implicated in HCV pathogenesis. In the postorgan transplant setting, numerous experimental studies have demonstrated that Tregs induce allograft tolerance [24, 25]. Tregs are influenced by immunosuppressive therapy; in particular, calcineurin inhibitors reduce Treg function *in vitro* [26]. It has also been shown that Treg levels fall significantly after LT, especially during allograft rejection [16, 27], and that the reduction in circulating Tregs is counterbalanced by an intragraft accumulation [28]. We recently evaluated the expression and activity of regulatory T-cells and their potential involvement in the accelerated progression of recurrent hepatitis C after LT. Our results suggested that classical CD4⁺CD25⁺ Tregs were significantly enhanced in recurrent hepatitis C and that Tr1 cells were specifically enhanced in severe recurrent hepatitis C [29]. We also found that serum IL-10 levels, characteristic of the Tr1 subset, were enhanced in patients prior to a severe recurrence, when compared with patients experiencing a mild recurrence of HCV [29].

In the present study, we further analyzed the potential correlation between regulatory T-cells (and particularly Tr1 cells) and the response to antiviral therapy after LT. For the first time, we have shown that Tr1 levels, as evaluated by the expression of the CD49b surface marker in serum, PBMC, or liver before the introduction of antiviral therapy,

were significantly lower in patients who would develop a sustained virological response (SVR). Since the determination of CD49b in serum seems to be predictive of treatment response, this new tool may be useful in the selection of liver transplant patients with HCV recurrence who are candidates for more intensive antiviral therapy.

2. Patients and Methods

2.1. Patients. Our study population was a cohort of 27 patients who had been included in the TRANSPEG study, which was a prospective, multicentre study (15 French centres) to assess the efficacy of antiviral therapy after LT, designed to determine whether 52 weeks of ribavirin maintenance monotherapy following 52 weeks of combination therapy procured an additional beneficial effect in recurrent HCV infection [30]; 101 adult recipients were enrolled, and all had proven chronic hepatitis with detectable serum HCV. Patients had to receive a stable calcineurin inhibitors immunosuppressive regimen. The 27 patients of 2 centres were included in this ancillary study.

The patients received peginterferon alfa-2a and ribavirin; after 52 weeks patients were randomized to receive either ribavirin or a placebo for further 52 weeks. All patients were followed up for 24 weeks after the end of therapy (Figure 1). The main time points in the analysis were baseline, 52 weeks (end of combination therapy), 78 weeks (6 months after the end of combination therapy), and 130 weeks (end of followup). The primary efficacy endpoint was a sustained virological response (SVR), defined as undetectable serum HCV, 6 months after the end of therapy.

The TRANSPEG study and the present ancillary study were approved by the Ethics Committee (CCPPRB) of Rennes (France). All patients gave their written informed consent before undergoing any protocol-related procedures.

Serum samples, available only from 27 patients enrolled in the TRANSPEG study, were evaluated for Treg transcriptomic analysis, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and liver biopsies were also available from some of these patients.

2.2. Transcriptomic Analysis. Transcriptomic analysis was performed on serum samples, PBMCs, and biopsies; using this technique on a large panel of genes, we had previously found a correlation between the liver, PBMC, and serum regarding the transcription of 219 genes [31]. Serum samples were analyzed at baseline, before the beginning of the treatment, at 12 months (end of the course of ribavirin and pegylated interferon), at 18 months, and at 30 months (6 months after the end of second therapeutic cycle) (Figure 1).

2.3. RNA Extraction. Total RNA was extracted from frozen liver biopsy samples and PBMCs using the RNeasy midi kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), as described by the manufacturer. In summary, samples were first lysed and then homogenized. Ethanol was added to the lysate to provide ideal binding conditions. The lysate was then loaded onto

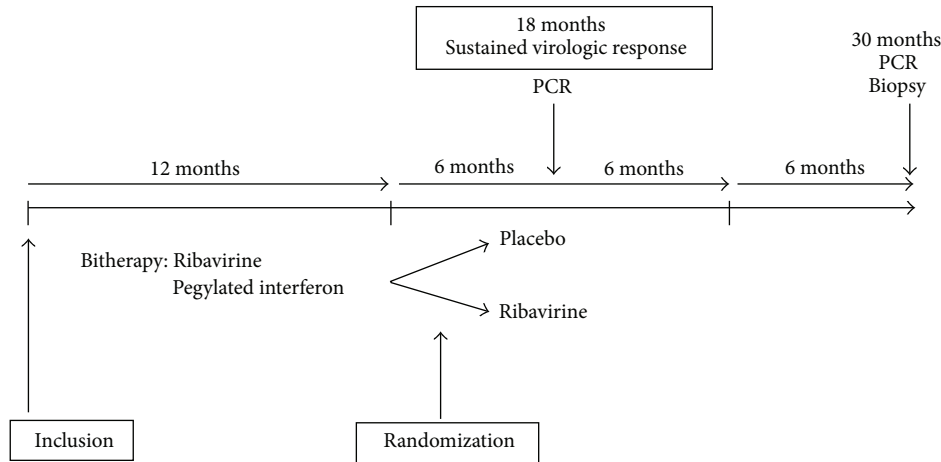


FIGURE 1: Design of the TRANSPEG study. All patients received Peginterferon alfa-2a and ribavirin. After 52 weeks of combination therapy, the patients were randomized to receive either ribavirin at the same dosage or a placebo for a further 52 weeks. All patients were followed up for 24 weeks after the end of treatment. The main time points in the analysis were: baseline, 52 weeks (end of combination therapy), 78 weeks (6 months after the end of combination therapy), and 130 weeks (end of follow-up). The primary efficacy endpoint was (1) sustained virological response, defined as undetectable serum HCV RNA. The secondary endpoints were changes from baseline histology findings as assessed by (2) the METAVIR activity and fibrosis score at 52, 78, and 130 weeks; (3) alanine aminotransferase (ALT) values over time; (4) the number of rejection episodes and the severity of rejection; (5) the occurrence of other severe antiviral-related adverse effects.

the RNeasy silica membrane for RNA binding, and all contaminants were efficiently washed away. Pure, concentrated RNA was eluted in water and stored at -80°C .

Serum mRNA extraction was achieved using the QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), as described by the manufacturer. Briefly, a serum sample was incubated with AVL buffer supplemented with Carrier RNA. After the addition of ethanol, the sample was applied to the QIAamp spin column and centrifuged. The column was then cleaned, and mRNA was eluted and stored at -80°C prior to analysis.

2.4. Reverse Transcription. RNA was supplemented with the following mixture [oligo dT (Roche, Meylan, France) + RNasin (PROMEGA, Charbonnières; France) + H_2O], and then incubated at 70°C for 5 minutes. After further 5 minutes at room temperature, the following mixture [buffer 5X (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) + DTT (Invitrogen) + dNTPs 10 mM + RNeasy (PROMEGA) + Superscript (Invitrogen)] was added. This reaction was followed by an initial incubation step at 45°C for 60 minutes and a second incubation at 95°C for 5 minutes. Finally, H_2O was added to obtain a concentration of 10 ng total RNA/1 μL .

2.5. ABI PRISM^R 7000 Sequence Detection System. The quantification of transcripts from liver, serum, and PBMC samples was performed using real-time quantitative RT-PCR with the ABI PRISM^R 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, CA, USA). All primers were designed for real-time PCR (Table 1) and purchased from MWG-Biotech (Germany). The mix was optimized for real-time PCR analysis using SYBR Green 1 Dye, AmpliTaq Gold DNA polymerase, dNTPs with UTP, Passive Reference 1 required for signal normalization, and optimized buffer components,

in a total volume of 50 μL . Each sample was run in a 96-well plate containing 94 primers by performing initial denaturation at 95°C for 5 minutes, after which PCR reactions were cycled 40 times as follows: 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C . Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. Melting curve analysis was performed immediately after amplification, in accordance with the manufacturer's instructions. The amplification of liver cDNA was successfully repeated twice with cDNA from the same extraction.

2.6. Light Cycler-Based PCR Assay. Genes whose expression level reached significance between the two groups of patients (SVR versus non-SVR) were further analyzed using light cycler-based PCR assay.

cDNA was synthesized from total RNA at a concentration of 100 ng/ μL using oligo dT primers and superscript reverse transcriptase (GIBCO BRL). The quantification of transcripts from samples was confirmed by real-time quantitative RT-PCR using the light cycler system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The PCR mixture contained the following: Taq polymerase, 1X of LightCycler-DNA master SYBRGreen I (Roche Diagnostics), 3 mM MgCl_2 , 0.5 $\mu\text{mol/L}$ of each primer, and 1 μL of the cDNA preparation (patient cDNA samples), in a total volume of 20 μL . Thirty-two samples were run in parallel by performing an initial denaturation at 95°C for 8 minutes, and then the PCR reactions were cycled 35 to 40 times as follows: 15 seconds at 95°C , 7 seconds at the appropriate annealing temperature (Table 2), and 18 to 64 seconds at 72°C according to the length of the target sequence annealing (40 s at 58°C). Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. A melting curve analysis was performed immediately after amplification, following the manufacturer's instructions.

TABLE 1: Primer sequence used in real-time RT-PCR.

Genes	Primers
<i>FOXP3</i>	5'-TCACCTACGCCACGGTCAT-3' 5'-CACAAAGCACTTGTGCAG-3'
<i>CD18</i>	5'-ATGCTTGATGACCTCAGGAATG-3' 5'-ACGGTCTTGCCACGAAGGA-3'
<i>CD49b</i>	5'-CAACGGGTGTGTGTTCTGACA-3' 5'-TCATCACACACAACCACAACATC-3'
<i>IL-10</i>	5'-GAGAACCAAGACCAGACAT-3' 5'-CCACGGCCTTGCTCTTGTT-3'
<i>IL-10 ra</i>	5'-CCGAGAGTATGAGATTGCCATTC-3' 5'-CAGATGGTTTCACCTGGACACA-3'
<i>CD40</i>	5'-TCCAGAACCACCCACTGCAT-3' 5'-CACCGCAAGGAAGGCATT-3'
<i>CD40L</i>	5'-GAAAGAAAACAGCTTTGA-3' 5'-TTTTTCAGCCACTGTAACA-3'
<i>GITR</i>	5'-TGTGTCCAGCCTGAATTCCA-3' 5'-CCGAGGCACAGTCGATACAC-3'
<i>CTLA-4</i>	5'-TTCTTCTTTCATCCCTGTCTTC-3' 5'-GAGATGCATACTCACACACAAA-3'
<i>PD-1</i>	5'-GCTACAACCTGGGCTGGCG-3' 5'-ATGTGTTGGAGAAGCTG-3'
<i>IL-2</i>	5'-ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTAC-3' 5'-TCCAGAGGTTTGAGTTCTTCTCTAGA-3'
<i>IFN-γ</i>	5'-ATGTAGCGAATAATGGAATC-3' 5'-GACATCAAGTCAGTTACC-3'
<i>TGF-β</i>	5'-CGAGCCTGAGGCCGACTAC-3' 5'-CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA-3'
<i>CD25</i>	5'-GGGACTGCTCACGTTTCATCA-3' 5'-TTCAACATGGTTCCCTTCCTTGAG-3'
<i>CD4</i>	5'-GGAAATCAGGGCTCCTTCT-3' 5'-TGGTCCCAAAGGCTTCTTCT-3'
<i>IL-4</i>	5'-CACAAGCAGCTGATCCGATTC-3' 5'-TCCAAGAAGTTTTCCAACGTA-3'
<i>β-ACTINE</i>	5'-AGCCACACGCAGCTCATTG-3' 5'-CACGGCATCGTCACCAACT-3'

2.7. Primers. All primers were designed for real-time PCR use and were purchased from MWG-Biotech (Table 2). The housekeeping genes β -Actin, Ubiquitin, HPRT, and G3PDH were used as controls. Genes representative of the Treg population were chosen, such as CD4, a glycoprotein predominantly found on the surface of helper T-cells, CD25, the alpha subunit of Interleukin-2 receptor, FoxP3, a member of the forkhead/winged-helix family of transcriptional regulators [32], CD127, the interleukin 7 receptor [33] that is specific to naturally occurring Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻Foxp3⁺), CD18, the integrin beta chain beta 2 [18], and CD49b, an integrin alpha subunit specific of Tr1 cells [34].

2.8. Cytometric Bead Array (CBA). To detect cytokines in the serum samples from our patients, the BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA) was used, as described by the manufacturer. The CBA assay permits simultaneous cytometric quantification of multiple cytokines in a sample by capturing them to spectrally distinct beads. Seven bead populations with distinct

TABLE 2: Demographic data of the cohort.

Characteristics	Distribution
Cohort study	27 patients
Inclusion date	August 2002 to January 2004
Time after transplant (year)*	3 (1, 8)
Age at selection*	56 (27, 68)
Gender	
Male	20
Female	7
HCV genotype**	Gen 1: <i>n</i> = 18 (67%), Gen 2: <i>n</i> = 1 (4%) Gen 3: <i>n</i> = 5 (18%), Gen 4: <i>n</i> = 3 (11%)
Immunosuppression	Tacrolimus: <i>n</i> = 16 (59%) Cyclosporine: <i>n</i> = 11 (41%)
Metavir <i>F</i> score at inclusion	<i>F</i> 1: <i>n</i> = 15 <i>F</i> 2: <i>n</i> = 8 <i>F</i> 3: <i>n</i> = 3 <i>F</i> 4: <i>n</i> = 1
Prothrombin time (%)	
Mean	90 \pm 9
Median (min; max)	90 (59; 107)
AST/ALT (UI/L)	
(mean)	75 \pm 45/100 \pm 60
(median, min; max)	58 (24; 196)/82 (32; 293)
Bilirubin blood level at inclusion (μ mol/L)	15.7 \pm 10.2
Viral load (log)	6.59 \pm 0.24

*Median value (min, max)

***n* = number of patients.

fluorescence intensities were coated with capture antibodies specific for IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-17A proteins. Human TH1/TH2/TH17 cytokine standards were reconstituted for 15 min in assay diluents, according to the manufacturer's immunofluorescence staining protocol. For all cytokine calibrator standards, serial dilutions were performed so that the serum was mixed with each human cytokine-capture bead combination, and then further incubated together with both the PE detection reagent and standard dilutions for 3 h at room temperature. The samples were then analyzed with a CANTO flow cytometer [35], using FCAP Array software to generate the results. Specific controls containing FITC- and PE-conjugated antibodies were supplied by the manufacturer [35] and were performed before each experiment.

2.9. Data Interpretation and Statistics. PCR results were analyzed using the "Relative Gene Expression Method," as described elsewhere [33]. Briefly, individual CT values were normalized using the average CT values for housekeeping genes (Δ CT = CT - CT_{HKG}). Average Δ CT values for each group were then compared with the Δ CT values of the control group (S group) using Wilcoxon-Mann-Whitney statistics. Statistical tests associated with *P* values lower than 0.05 were considered to be significant. For relevant genes, binary prognostic tests for the response to antiviral therapy

were constructed. To do this, optimum cut-off values were determined according to Youden's index. The sensitivity and specificity of these tests were then computed. It should be recalled that in this setting, sensitivity was defined as the probability of a positive test at J0 for responders (at M18), while specificity was the probability of a negative test at J0 for nonresponders (at M18). Statistical analyses were performed using SAS software, version 9.1.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Population. The study cohort comprised 27 patients from the 101 patients included in the TRANSPEG study that was designed to evaluate antiviral therapy in recurrent hepatitis C. Serum samples for the Treg analysis, and clinical data collected during the TRANSPEG study, were available for all of these 27 patients. Table 2 shows the demographic parameters of this population of 20 men and 7 women, with a median age of 56 years. METAVIR scores for fibrosis were distributed as follows: F1 in 15 patients, F2 in 8 patients, and F3, F4 in 3 and 1 patients, respectively. The patients were split into two groups in terms of their response to the primary criteria of the Transpeg protocol, that is, their virological response at 18 and 30 months (M) after inclusion. 62% of the 27 patients available were virological responders at M18 and continued to display a virological response at M30 (Table 3). These rates were similar to those obtained for all the patients included in the Transpeg study. Because the SVR rates were identical at M18 and M30, we therefore considered SVR as the virological response obtained at M18 and analyzed the parameters relative to this response. Furthermore, as in the whole Transpeg study, maintenance therapy with ribavirin alone did not improve either the virological response or the histological parameters (data not shown). The characteristics of patients in both groups (responders and non-responders) at M18 are shown in Table 3, Viral load, METAVIR score for fibrosis, immunosuppressive therapy, and donor age were similar in the two groups.

3.2. Serum Gene Expression of T Regulatory Markers at Baseline. The serum expression of classic Treg markers was similar in patients with and without SVR (data not shown).

By contrast, Tr1 levels, as assessed by the expression of the CD49b surface marker, were significantly associated with SVR. Indeed, at baseline, serum *CD49b* gene expression levels (relative expression: -2.93 CD49b [min; max: -11.29 ; 1.56]) were significantly lower in patients who would develop SVR when compared to non-responders (relative expression: -0.21 CD49b [min, max: -5.29 ; $+21.9$], $P < 0.02$) (Figure 2(a)).

Using an optimum cutoff of relative expression of -1.40 , the sensitivity of CD49b < -1.40 to predict SVR was 0.917 (92%) (0.646–0.985), the specificity was 0.583 (58%) (0.320–0.807), and the area under rOC Curve was 0.771 (95% CI: 0.576–0.966).

The serum expression of other Tr1 markers did not differ significantly between SVR and non-SVR patients. Nevertheless, although it was not significant, the relative expression

of *IL-10* and *CD18* gene expressions was lower in patients who would develop SVR $+1.99$, (95%, 0.27; 7.53) and $+1.89$ (95%, 0.31; 4.99) than in non-responders $+3.61$ (-2.01 ; $+8.91$), $P = 0.09$ and $+2.75$ (-1.28 ; $+5.34$), $P = 0.008$, respectively.

Results were confirmed by the light cycler-based PCR assay (Figure 2(b)).

3.3. Baseline Gene Expression of CD49b in PBMC. PBMCs were only available from ten of the study patients. As with serum transcriptional analysis, the results of PBMC mRNA analysis using the light cycler system revealed a lower *CD49b* gene expression in patients with SVR, but the difference was not significant ($P = 0.06$) (Figure 2(c)).

3.4. Baseline Gene Expression of CD49b in Liver Biopsy. Like the findings in serum and PBMC, the *CD49b* gene expression levels obtained in seven biopsy samples obtained from the study groups using the light cycler system were lower in the responder group than in the non-responder group ($P = 0.07$) (Figure 2(d)).

3.5. Peripheral Gene Expression of T Regulatory Markers at M12. The relative expressions of the same genes were also analyzed at 12 months (end of first course of antiviral therapy and time of randomization for the second course), and we looked for a correlation between the level of expression and the outcome of treatment, namely, SVR at 18 and 30 months. Using the ABI PRISM^R 7000 Sequence Detection System again, we found no association between the levels of all genes analyzed at 12 months and SVR at 18 and 30 months.

3.6. Cytometric Bead Array (CBA) at Baseline. Cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNE, IFN- γ , and IL-17A) were also assessed using the Cytometric Bead Array technology in sera from the 27 patients. None of these cytokine levels reached statistical significance regarding a prediction of the response to antiviral therapy; nevertheless, although it was not statistically significant, for IL-10, serum concentration was lower in patients who would develop SVR (15 ± 5 ng/mL) when compared to nonresponders (22 ± 12 ng/mL, $P = 0.075$) (data not shown).

4. Discussion

We had recently observed that Treg markers were significantly enhanced in recurrent hepatitis C after LT and that Tr1 cell levels were specifically elevated in severe recurrent hepatitis C when compared to in mild recurrence [29]. The present study analyzed the potential correlation between regulatory T-cells, particularly Tr1, and the response to antiviral therapy after LT. This cohort study was extracted from a prospective clinical study designed to evaluate the treatment of recurrent HCV in liver transplant recipients. Serum samples were only available from 27 of the 101 patients included, but all data collected before, during, and after antiviral therapy were available for these patients. Initial

TABLE 3: Characteristics of responder and nonresponder groups at 18 months.

Characteristics	Responder (PCR < 0) N = 16	Nonresponder (PCR > 0) N = 11	P
% of patients	62%	38%	
Age (years)	54 ± 13	57 ± 7	0.53
Weight (kg)	74.7 ± 12.7	80.3 ± 14.3	0.39
HCV genotype	Gen 1: n = 10 (62%) Gen 2: n = 1 (6.5%) Gen 3: n = 4 (25%) Gen 4: n = 1 (6.5%)	Gen 1: n = 8 (73%) Gen 2: n = 0 Gen 3: n = 1 (9%) Gen 4: n = 2 (18%)	
Basal Creatinine (μmol/L)	21.8 ± 24.9	103.3 ± 39.9	0.26
Cyclosporin/Tacrolimus	6 (46%)/7 (54%)	3 (38%)/5 (62%)	
Use of EPO	All patients	All patients	
Viral load (log)	6.22 ± 0.59	6.75 ± 0.42	0.54
METAVIR score (n)	F1 (10) F2 (5) F3 (1) F4 (0)	F1 (5) F2 (3) F3 (2) F4 (1)	
Donnor age > 40	53%	58%	NS

experiments were performed on sera; this choice was deliberate although not optimum, because more serum samples than PBMC were available from the TRANSPREG patients. The data obtained with the ABI PRISM^R 7000 Sequence Detection System was validated using the light cycler-based PCR assay in sera, PBMC, and biopsies.

The findings of this study show for the first time that serum Tr1 gene expression levels, assessed from the expression of the surface marker CD49b before the introduction of antiviral therapy, were predictive of an SVR in patients with recurrent hepatitis C after LT. This result was confirmed in PBMC and liver biopsies obtained from the same patients, even if not statistically significant due to the poor number of samples. Patients with low Tr1 cell levels at baseline had a greater chance of a successful virological response than those with high Tr1 levels. Because HCV genotypes 1 and 4 are more resistant to antiviral therapy than 2 and 3, we checked that the predictive effect of CD49b on SVR was independent of the HCV genotype. It remains to be determined whether low Tr1 levels are constitutive or due to the patient's individual response to immunosuppressive therapy. Treg levels (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) have already been evaluated during antiviral HCV therapy, and it has been suggested that they could predict the result of combination therapy [36]. We did not obtain this result in liver transplant recipients, probably because immunosuppressive therapy exerts a strong inhibitory effect on classical Tregs.

We hypothesize that Tr1 CD49b⁺ cells play a role in failure of the immune response during HCV recurrence after liver transplantation and may also participate in the failure of antiviral therapy. CD49b assessment in serum is predictive of the response to antiviral therapy. This new tool may help to select liver transplant recipients with HCV recurrence as candidates for more intensive antiviral therapy. This is an important finding because a recurrence of HCV infection is

almost universal after LT, leading to accelerated disease when compared to that seen in immunocompetent patients [37] and to impaired patient and allograft survival [38], although some patients experience slow and progressive disease [35]. Moreover, pegylated interferon and ribavirin combination therapy in the transplant population is associated with serious adverse effects and a risk of rejection, with a sustained virological response rate reported as ranging from 26% to 48% [39, 40]. For this reason, antiviral therapy should be preferentially recommended in patients whose disease progression is highly predictive.

T-regulatory cells work, firstly, towards achieving tolerance of the graft [41] and secondly may enhance the severity of viral recurrence [42]. Our findings agree with these statements so that a patient with high Tr1 levels may appear to be at a greater risk of developing severe recurrent hepatitis C and with less chance of being treated effectively.

In the present study, *CD49b* was the only gene characterizing the Tr1 cell population as being associated significantly with the outcome of antiviral therapy. CD18, another specific marker for Tr1, was associated with CD49b in our previous study [29], but in this case CD18 was not associated with the outcome of antiviral therapy, even if we have obtained a non significant higher relative gene expression of *CD18* marker in non responder patients compared with responder ones. However, CD18 is a less specific marker of Tr1 than CD49b and it is expressed by numerous cell populations. In Tr1 cells, only a strong expression of CD18 is associated with CD49b expression [18, 34, 43]. Serum CD18 levels could have been influenced in different cell types by a variety of factors resulting in dissociation from CD49b, thus explaining why the difference between the low and high expression of *CD18* was not discriminately identified by PCR analysis. Although these data are encouraging, we acknowledge several limitations concerning the validation of CD49b expression level

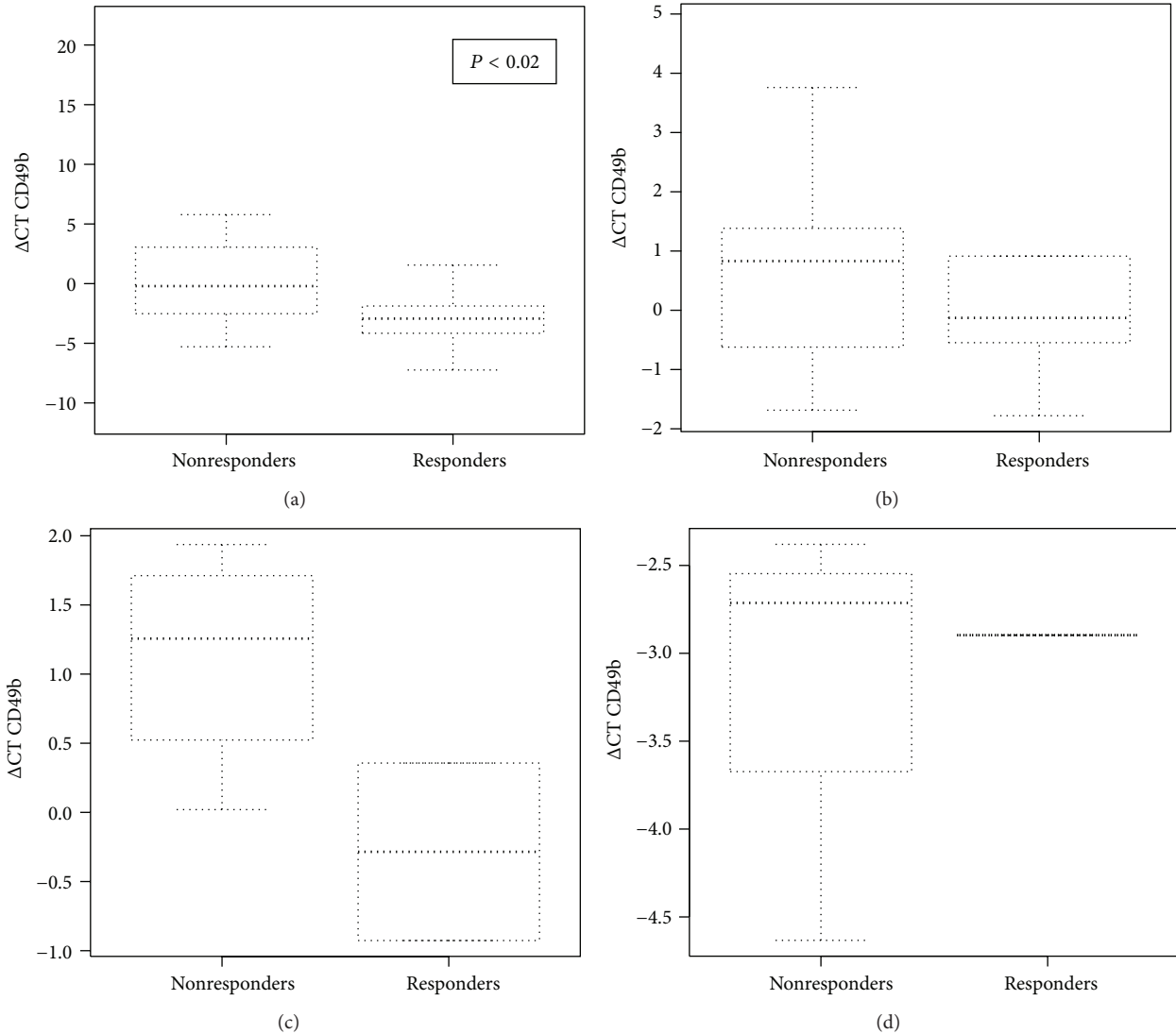


FIGURE 2: Relative expression of the CD49b marker using RT-PCR in responder and nonresponder groups. The responder group was defined by undetectable HCV RNA in peripheral blood, 18 and 30 months after beginning of the treatment (6 months after end of pegylated interferon + Ribavirin). (a) RT-PCR results obtained with Abi prism on sera from the patients. (b) RT-PCR results obtained with the light cycler in order to confirm Abi prism results on patient sera. (c) Results of RT-PCR on PBMC. (d) Results of RT-PCR on graft biopsies. Data are expressed as box plots in which the horizontal lines indicate the 25th, 50th, and 75th percentiles of the frequencies of the relative expression of CD49b, as measured by RT-PCR. The vertical lines represent the 10th and 90th percentiles.

by complementary techniques. However, we can reasonably assume that the result obtained by RT-QPCR on serum RNA concerning CD49b level could be relevant in the context of the liver tissue. Indeed, it should be noted that a preliminary study from our team [29] has already established a closed correlation between the *CD49b* gene expression in the serum and the expression level of CD49b in the liver.

Moreover, because of the lack of numerous samples, it was not possible in this transcriptomic analysis to establish correlation between the different compartments studied, namely, serum, PBMC, and liver. However, we can assume that this correlation exists, since we published a previous study in which gene transcription was compared in 219 selected genes involved in the pathogenesis of HCV infection between sera,

PBMCs, and liver samples collected simultaneously from five patients infected chronically. After amplification, significant correlations were observed between liver versus serum; liver versus PBMCs; and serum versus PBMCs [31]. In addition, a prospective trial is currently under way to confirm these data and to add functional assays, but the results will not be available for several years.

In conclusion, our results showed that the relative gene expression of *CD49b* was predictive of an SVR to treatment in the TRANSPEG study group. It is already well described in the literature that HCV genotypes 1 and 4 are more resistant to antiviral therapy than genotypes 2 and 3. We therefore verified whether this could influence our analysis, and if the difference shown was only due to responder genotypes,

but in fact most of the responders were of genotypes 1 and 4. As expected, Tr1CD49b⁺ cells were predictive factors for a treatment response but there was no correlation with the HCV genotype.

Thus, Tr1 CD49b⁺ cells appear to play a role in failure of the immune response to HCV during its recurrence after LT and may also participate in the failure of antiviral therapy. Determining serum CD49b levels is predictive of the response to antiviral therapy. This new tool could be of value to select liver transplant recipients experiencing HCV recurrence as candidates for earlier and more intensive antiviral therapy. Further research is required to confirm these findings and particularly to verify whether CD49b is an independent predictive factor of response to antiviral therapy.

Abbreviations

HCV:	Hepatitis C virus
LT:	Liver transplantation
Th1:	T helper 1
Treg:	regulatory T-cell
Tr1:	Type 1 regulatory T-cell
SVR:	Sustained virological response
PBMC:	Peripheral blood Mononuclear cell
HCC:	Hepatocellular carcinoma
CNI:	Calcineurin inhibitors
Tac:	Tacrolimus.

Conflict of Interests

The authors of this paper have no conflict of interests to disclose.

Authors' Contribution

Stenard Fabien, Morales Olivier, Ghazal Khazal, Laurissa Ouaguia, and Aoudjehane Lynda performed the research; Viallon Vivian performed statistical analysis; Calmus Yvon, Delhem Nadira, and Conti Filomena designed research; Conti Filomena and Delhem Nadira wrote the paper and contributed equally to this work. Stenard Fabien; and Morales Olivier contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work received support from the Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les Hépatites (ANRS) and Stenard Fabien received a support from the Société Francophone de Transplantation (SFT). This work was supported by SIRIC ONCOLille.

References

- [1] F. Negro and A. Hadengue, "Therapy of chronic hepatitis B," *Revue Medicale Suisse*, vol. 2, no. 77, pp. 1981–1985, 2006.
- [2] S. M. Kamal, C. S. Graham, Q. He et al., "Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)—specific CD4⁺ T cell responses in HCV and Schistosoma mansoni coinfection: relation to progression of liver fibrosis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 189, no. 7, pp. 1140–1150, 2004.
- [3] M. P. Curry, "Hepatitis B and hepatitis C viruses in liver transplantation," *Transplantation*, vol. 78, no. 7, pp. 955–963, 2004.
- [4] E. Velidedeoglu, K. C. Mange, A. Frank et al., "Factors differentially correlated with the outcome of liver transplantation in HCV⁺ and HCV⁻ recipients," *Transplantation*, vol. 77, no. 12, pp. 1834–1842, 2004.
- [5] M. Berenguer, M. Prieto, F. San Juan et al., "Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients," *Hepatology*, vol. 36, article 202, 2002.
- [6] R. Thimme, D. Oldach, K. Chang, C. Steiger, S. C. Ray, and F. V. Chisari, "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 10, pp. 1395–1406, 2001.
- [7] J. T. Gerlach, H. M. Diepolder, M.-C. Jung et al., "Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4⁺ T-cell response in acute hepatitis C," *Gastroenterology*, vol. 117, no. 4, pp. 933–941, 1999.
- [8] S. Tsai, Y. Liaw, M. Chen, C. Huang, and G. C. Kuo, "Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity," *Hepatology*, vol. 25, no. 2, pp. 449–458, 1997.
- [9] M. Murata, S. Nabeshima, N. Maeda, H. Nakashima, S. Kashiwagi, and J. Hayashi, "Increased frequency of IFN- γ -producing peripheral CD8⁺ T cells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C," *Journal of Medical Virology*, vol. 67, no. 2, pp. 162–170, 2002.
- [10] A. O'Garra and P. Vieira, "Regulatory T cells and mechanisms of immune system control," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 8, pp. 801–805, 2004.
- [11] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, J. Shimizu et al., "Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance," *Immunological Reviews*, vol. 182, pp. 18–32, 2001.
- [12] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases," *Journal of Immunology*, vol. 155, no. 3, pp. 1151–1164, 1995.
- [13] J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi, "Stimulation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 2, pp. 135–142, 2002.
- [14] B. Birebent, R. Lorho, H. Lechartier et al., "Suppressive properties of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression," *European Journal of Immunology*, vol. 34, no. 12, pp. 3485–3496, 2004.
- [15] S. Hori, T. Nomura, and S. Sakaguchi, "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3," *Science*, vol. 299, no. 5609, pp. 1057–1061, 2003.
- [16] M. E. Morgan, J. H. M. van Bilsen, A. M. Bakker et al., "Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells in humans," *Human Immunology*, vol. 66, no. 1, pp. 13–20, 2005.
- [17] H. Groux, A. O'Garra, M. Bigler et al., "A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis," *Nature*, vol. 389, no. 6652, pp. 737–742, 1997.

- [18] M. Rahmoun, A. Foussat, H. Groux, J. Pène, H. Yssel, and P. Chanez, "Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 140, no. 2, pp. 139–149, 2006.
- [19] H. L. Weiner, "Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells," *Immunological Reviews*, vol. 182, pp. 207–214, 2001.
- [20] R. Cabrera, Z. Tu, Y. Xu et al., "An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection," *Hepatology*, vol. 40, no. 5, pp. 1062–1071, 2004.
- [21] S. M. Rushbrook, S. M. Ward, E. Unitt et al., "Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during persistent hepatitis C virus infection," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7852–7859, 2005.
- [22] T. Boettler, H. C. Spangenberg, C. Neumann-Haefelin et al., "T cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during chronic hepatitis C virus infection," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7860–7867, 2005.
- [23] A. J. MacDonald, M. Duffy, M. T. Brady et al., "CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 185, no. 6, pp. 720–727, 2002.
- [24] M. M. Velásquez-Lopera, V. L. Eaton, N. M. Lerret et al., "Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells," *Transplant Immunology*, vol. 19, no. 2, pp. 127–135, 2008.
- [25] O. Joffre, T. Santolaria, D. Calise et al., "Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes," *Nature Medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 88–92, 2008.
- [26] R. Zeiser, V. H. Nguyen, A. Beilhack et al., "Inhibition of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production," *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 390–399, 2006.
- [27] A. Demirkiran, A. Kok, J. Kwekkeboom et al., "Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation," *Liver Transplantation*, vol. 12, no. 2, pp. 277–284, 2006.
- [28] F. Stenard, C. Nguyen, K. Cox et al., "Decreases in circulating CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ cells and increases in intra-graft FOXP3⁺ cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients," *Pediatric Transplantation*, vol. 13, no. 1, pp. 70–80, 2009.
- [29] A. Carpentier, F. Conti, F. Stenard et al., "Increased expression of regulatory tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 9, no. 9, pp. 2102–2112, 2009.
- [30] Y. Calmus, C. Duvoux, G. Pageaux et al., "Treatment of recurrent HCV infection following liver transplantation: results of a multicenter, randomized, versus placebo, trial of ribavirin alone as maintenance therapy after one year of PegIFNalpha-2a plus ribavirin," *Journal of Hepatology*, vol. 57, p. 564, 2012.
- [31] A. Carpentier, F. Conti, M. Carrière et al., "Analysis of gene transcription in sera during chronic hepatitis C infection," *Journal of Medical Virology*, vol. 81, no. 3, pp. 473–480, 2009.
- [32] X. Zhou, S. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker, and J. A. Bluestone, "Plasticity of CD4⁺ FoxP3⁺ T cells," *Current Opinion in Immunology*, vol. 21, no. 3, pp. 281–285, 2009.
- [33] A. H. Banham, "Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3⁺ regulatory T cells," *Trends in Immunology*, vol. 27, no. 12, pp. 541–544, 2006.
- [34] L. Charbonnier, L. M. Van Duivenvoorde, F. Apparailly et al., "Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b⁺ regulatory T cells," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 6, pp. 3806–3813, 2006.
- [35] R. J. Firpi, M. F. Abdelmalek, C. Soldevila-Pico et al., "One-year protocol liver biopsy can stratify fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C infection," *Liver Transplantation*, vol. 10, no. 10, pp. 1240–1247, 2004.
- [36] M. Akiyama, T. Ichikawa, H. Miyaaki et al., "Relationship between regulatory T cells and the combination of pegylated interferon and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis type C," *Intervirology*, vol. 53, no. 3, pp. 154–160, 2010.
- [37] C. Feray, L. Caccamo, G. J. M. Alexander et al., "European collaborative study on factors influencing outcome after liver transplantation for hepatitis C," *Gastroenterology*, vol. 117, no. 3, pp. 619–625, 1999.
- [38] L. M. Forman, J. D. Lewis, J. A. Berlin, H. I. Feldman, and M. R. Lucey, "The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation," *Gastroenterology*, vol. 122, no. 4, pp. 889–896, 2002.
- [39] J. Dumortier, J. Scaozec, P. Chevallier, and O. Boillot, "Treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation: a pilot study of peginterferon alfa-2b and ribavirin combination," *Journal of Hepatology*, vol. 40, no. 4, pp. 669–674, 2004.
- [40] H. Rodriguez-Luna, A. Khatib, P. Sharma et al., "Treatment of recurrent hepatitis C infection after liver transplantation with combination of pegylated interferon α 2b and ribavirin: an open-label series," *Transplantation*, vol. 77, no. 2, pp. 190–194, 2004.
- [41] T. Manigold and V. Racanelli, "T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 7, no. 12, pp. 804–813, 2007.
- [42] S. Smyk-Pearson, L. Golden-Mason, J. Klarquist et al., "Functional suppression by FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 197, no. 1, pp. 46–57, 2008.
- [43] L. Charbonnier, W. G. H. Han, J. Quentin et al., "Adoptive transfer of IL-10-secreting CD4⁺CD49b⁺ regulatory T cells suppresses ongoing arthritis," *Journal of Autoimmunity*, vol. 34, no. 4, pp. 390–399, 2009.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>



ARTICLE 7 (REVUE)

Le virus de l'hépatite C contribue à l'aggravation de l'environnement immuno-suppresseur en augmentant le phénotype et l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs humains.

Laurissa Ouaguia , Nadira Delhem

1-

CCL17 produite par la DC. Sachant que les DC sont les principales cibles cellulaires des nouveaux vaccins, nos résultats identifient NOD1 comme une nouvelle voie au niveau de ces cellules, susceptible de jouer un rôle important dans la modulation de la réponse immune. Il serait donc primordial de tenir compte de la présence des ligands de NOD1 lors de la formulation des vaccins, afin d'éviter l'amplification de la réponse inflammatoire chez les asthmatiques.

Afin de se rapprocher de la physiopathologie humaine, un modèle d'asthme allergique aux acariens a été développé. Ce modèle expérimental d'asthme allergique aigu induit par l'acarien *Dermatophagoides farinae*, reproduit les paramètres cardinaux de l'asthme allergique, tels que la réponse humorale, le recrutement cellulaire dans le lavage broncho-alvéolaire, la production en cytokines et chimiokines dans le poumon et l'hyperréactivité des voies aériennes. Le rôle de NOD1 dans ce modèle sera déterminé par l'utilisation de souris déficientes en NOD1.

Ce travail devrait permettre de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'action intervenant dans l'exacerbation de l'asthme allergique, impliquant le récepteur NOD1 et, par conséquent, NOD1 pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans cette maladie inflammatoire chronique.

REFERENCES

1. Page K et al 2008. TLR2-mediated activation of neutrophils in response to German cockroach frass. *J Immunol* 180:6317-6324.
2. Trompette A et al 2009. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457:585-588.
3. Hammad H et al 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15:410-416.
4. Ting J P et al 2008. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 28:285-287.
5. Chamaillard M et al 2003. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 5: 581-592.
6. Weidinger S et al 2005. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 116:177-184.
7. Hysi P et al 2005. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet* 14:935-941.
8. Bogefors J et al 2010. Nod1, Nod2 and Nalp3 receptors, new potential targets in treatment of allergic rhinitis? *Allergy* 65:1222-1226.
9. Fritz J H al 2007. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* 26:445-459.
10. Ait Yahia S et al 2014. CCL17 Production by Dendritic Cells Is Required for NOD1-mediated Exacerbation of Allergic Asthma, *Am J Resp Crit Care Med* 189:899-908.

LE VIRUS DE L'HÉPATITE C CONTRIBUE À L'AGGRAVATION DE L'ENVIRONNEMENT IMMUNO-SUPPRESSEUR EN AUGMENTANT LE PHÉNOTYPE ET L'ACTIVITÉ SUPPRESSIVE DES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS HUMAINS

Laurissa Ouaguia
Nadira Delhem

CNRS UMR8161- Laboratoire
«ImmunoRégulation des Cancers
Viro-induits»

laurissa.ouaguia@ibl.cnrs.fr

2

Ce prix du meilleur poster de la thématique «Infection and Immunity» a été attribué grâce au soutien financier de la Société Roche

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont des cellules de l'immunité adaptative qui expriment un récepteur T pour l'antigène TCR (*T-cell receptor*) et possèdent la capacité de reconnaître des peptides du soi présentés par le CMH de classe II. Leur rôle consiste à supprimer ou à moduler les réponses immunitaires de l'hôte dans les pathologies auto-immunes, allergiques, tumorales ou infectieuses. En fonction du site de différenciation, on distingue deux populations majoritaires : les Treg naturellement générés dans le thymus (tTreg) encore appelés Treg naturels (nTreg) et les Treg différenciés en périphérie (pTreg) sous l'influence d'une stimulation antigénique et/ou de cytokines secrétées par les cellules de l'environnement et en l'absence d'une costimulation via l'interaction CD28-CD80/86, aussi appelés Treg induits (iTreg). Il n'existe pas de marqueurs spécifiques de ces deux types de cellules ; néanmoins les nTreg peuvent être caractérisés par l'expression concomitante d'un ensemble de marqueurs et notamment le CD4, CD25, FOXP3, CTLA-4 et une sous-expression du CD127. Les nTreg représentent environ 5 à 10% des lymphocytes T CD4⁺ présents dans le sang et sont anergiques *in vitro* (1). Les nTreg sont responsables de la tolérance centrale du soi et empêchent le développement de maladies inflammatoires auto-immunes. Les iTreg, quant à eux, peuvent être caractérisés par l'expression de marqueurs tels que le CD49b, le CD18 et LAG-3 (2) et ils contrôlent principalement la tolérance des muqueuses mais favorisent aussi la tolérance du greffon et la tolérance fœto-maternelle. Ces iTreg représentent la plus grande proportion des Treg présents dans les cancers et ils peuvent être subdivisés en Tr1, Th3 et iT35 en fonction de la cytokine principale qui est sécrétée. Ces différentes catégories de Treg participent ainsi au maintien de l'homéostasie immunitaire.

Mécanisme d'action des Treg

Les Treg inhibent la réponse immune (i) en modifiant le métabolisme cellulaire, (ii) en limitant la prolifération des autres cellules immunitaires effectrices, (iii) en induisant l'apoptose et (iv) en inhibant la maturation et l'activité des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). L'ensemble de ces

fonctions passent par des mécanismes contact-cellulaire-dépendants et/ou via la sécrétion de facteurs et de cytokines immunosuppressives IL-10, TGF- β et IL-35 (3). Par ces mécanismes, les Treg participent ainsi au maintien de l'homéostasie immunitaire en conditions physiologiques. Cependant, l'activité des Treg peut être subversive en cas de pathogénicité. En effet, dans un environnement infectieux ou tumoral, l'activité des Treg conduit à l'inhibition des réponses immunes anti-infectieuses et/ou anti-tumorales, favorisant ainsi l'installation et la persistance de la pathologie (4,5).

Histoire de l'hépatite C

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est caractérisée par un risque élevé de chronicité pouvant évoluer vers la cirrhose et le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) (4,5). De nombreuses études attribuent cette chronicité à des raisons multifactorielles telles que les caractéristiques virologiques du VHC (rapidité des cinétiques de réplication, variabilité génétique) (6), mais aussi à une altération de la réponse immunitaire chez les patients infectés (4,5,7). En outre, la fréquence et l'activité élevée des Treg chez les patients infectés suggèrent un rôle primordial des Treg dans l'inhibition de résolution d'infection. Malgré les récentes avancées dans le traitement de l'hépatite C, il n'existe toujours pas de vaccin contre le VHC. En outre, ces nouveaux traitements sont inefficaces pour 10% des patients chroniquement infectés (8) et ne protègent pas d'une récurrence après transplantation hépatique, ni d'une réinfection par le VHC. Ainsi, pour améliorer encore plus la réponse aux traitements, il apparaît pertinent d'étudier les mécanismes par lesquels le VHC détourne la réponse immune. Mon travail de recherche s'inscrit justement dans ce contexte et vise à étudier ces mécanismes d'immunorégulation induit par le VHC.

Treg et Virus de l'hépatite C

De nombreuses études dont les nôtres attribuent les raisons de l'aggravation de l'hépatite C en partie aux Treg (nTreg et Tr1) qui par leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- β inhibent l'activité antivirale, favorisant ainsi la persistance du virus (5,7,9). En effet, l'équipe dirigée par le Dr Delhem a montré une augmentation de la

fréquence des nTreg et Tr1 à la fois au niveau périphérique et intra-hépatique chez des patients transplantés pour cause virale C (2,7). Elle a également décrit un recrutement important de ces Treg au cours de l'évolution de la fibrose hépatique vers le CHC (4,5). Par ailleurs, les travaux de l'équipe suggèrent que la fréquence élevée des Treg prédirait une mauvaise réponse au traitement antiviral et un risque plus élevé d'avoir une rechute après transplantation (7). L'histoire du VHC semble donc étroitement liée aux Treg. L'enjeu fondamental de mon travail est de caractériser les mécanismes mis en jeu par le VHC pour détourner la réponse immune. En effet, je m'efforce de déterminer si en interagissant directement avec le VHC, les nTreg et Tr1 pourraient favoriser l'aggravation de l'hépatite C.

Méthodologie:

Pour répondre à cette question, les cellules immunitaires d'intérêt (nTreg) ont été isolées à partir de poche de sang de donneurs sains, puis infectées *in vitro* par des particules virales infectieuses produites en culture cellulaire (VHCcc) après transfections des Huh7 par le réplikon génomique de taille complète JFH-1.

Les nTreg isolés *ex vivo* sont fonctionnels

Au laboratoire, les nTreg ont été isolés grâce à des micro-billes magnétiques sur la base de l'expression des marqueurs CD4 et CD25. Les cellules ont ensuite été phénotypiquement caractérisées par cytométrie en flux. Les résultats de cette analyse montre que les nTreg isolés possèdent bien le phénotype suppresseur CD4⁺CD25^{+/high}CD127^{-/low}. Par ailleurs, la caractérisation fonctionnelle de ces cellules par des tests de suppression montre que ces nTreg isolés inhibent la prolifération des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Notre première interrogation a été de savoir si les Treg pouvait être infectés par le VHC.

Les nTreg possèdent les récepteurs d'entrée du VHC

Le VHC a été longtemps considéré comme essentiellement hépatotrope, bien que quelques études récentes suggèrent un possible lymphotropisme. Ceci laisse entrevoir l'existence des récepteurs du VHC sur certaines cellules lymphocytaires. Les résultats

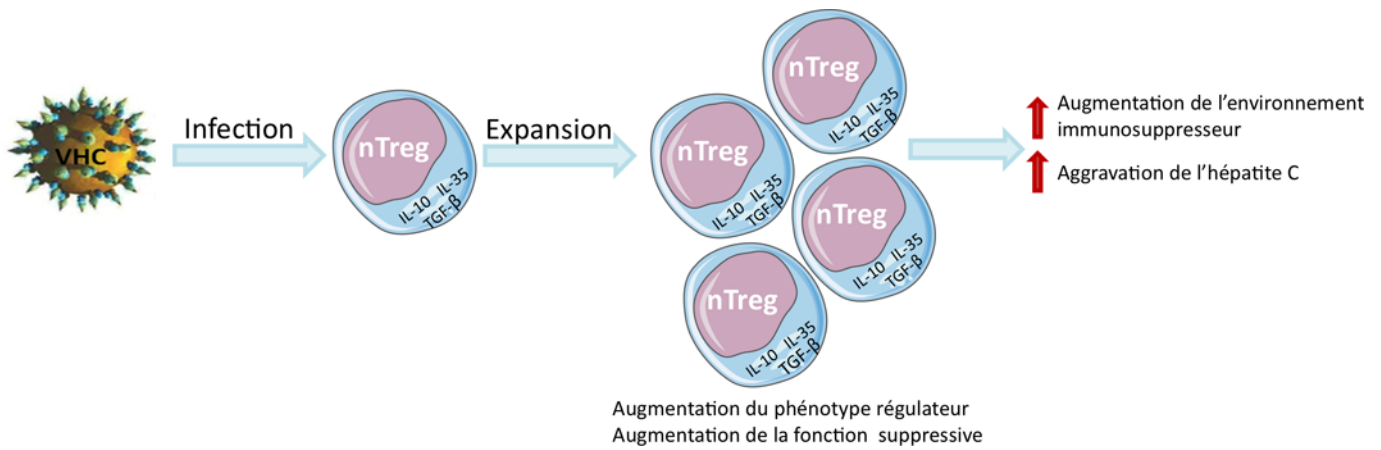


Figure 1 : Impact du VHC sur l'aggravation de l'environnement immunosuppresseur

de mes travaux montrent que les nTreg humains isolés *ex vivo* possèdent tous les récepteurs principaux du VHC tels que le CD81, le LDL-R, l'EGF-R, le SRB1, l'Occludine et la Claudine-1. Le CD81 (10) et la Claudine-1 sont décrits comme les récepteurs responsables du tropisme cellulaire du VHC et leur expression par les nTreg, associée à celle de SRB1, LDLR et Occludine, suggèrent que ces cellules sont potentiellement infectables par le VHC. Nous avons également montré que le contact du VHC engendre une augmentation de l'expression des récepteurs d'entrée du VHC sur les nTreg. En outre, mes travaux révèlent que la présence du VHC conduit à l'augmentation de l'expression d'un ensemble de co-récepteurs associés au VHC que sont les *Toll-like receptors* (TLR)2, 3, 4 et 7. Ces résultats montrent donc que les nTreg seraient infectables par le VHC. *Mais ce virus peut-il réellement s'internaliser dans un Treg ?*

Les nTreg internalisent le VHC

Classiquement, l'interaction des particules virales du VHC avec leurs récepteurs hépatocytaires conduit à l'internalisation du virus par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante. La fusion des membranes de l'endosome avec celle du virus représente l'étape finale de l'entrée, rapidement suivie par la libération du génome et de l'expression des protéines virales. Nos expériences d'immunofluorescence et d'analyse par *Western blotting* révèlent que les Treg infectés par le VHC expriment les protéines virales E1, E2, CORE et NS5A, suggérant que les nTreg peuvent internaliser le VHC. *Mais quel peut être l'impact d'une internalisation ou même d'un simple contact du VHC sur le phénotype des Treg ?*

Le VHC augmente le phénotype suppresseur des nTreg

J'ai effectué des cocultures de nTreg avec des particules virales et analysé ainsi l'impact du VHC sur le phénotype suppresseur des nTreg 3h post infection (3 hpi : contact abrégé) et 24 hpi (contact prolongé). Les analyses effectuées montrent que le VHC augmente significativement l'expression de l'ensemble des marqueurs associés au phénotype suppresseur des nTreg tels que le CD25, FOXP3, LAG3 et CTLA-4. Ce résultat suggère donc que le VHC augmente le phénotype suppresseur des nTreg. *Cependant, le VHC peut-il réellement modifier l'activité suppressive des nTreg ?*

Le VHC potentialise l'activité suppressive des nTreg

Mes travaux révèlent que le VHC augmente de façon significative l'expression de tous les marqueurs associés à la fonction suppressive des nTreg, tels que (i) l'augmentation de l'expression des Granzymes A/B, TRAIL et IL-2-Rα qui induisent la cytolyse et l'apoptose et (ii) l'augmentation de l'expression d'IL-10, IL-35, TGF-β1, Galectine 9 et LAG3 qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'inactivation des CPA. De façon plus intéressante, l'évaluation de l'activité suppressive des nTreg sur la prolifération des PBMC révèle que les nTreg infectés sont significativement plus suppresseurs que les nTreg non-infectés. Ces résultats suggèrent ainsi que le VHC potentialise l'activité suppressive des nTreg.

Le VHC modifie l'état d'anergie connu des nTreg

Comme mentionné au préalable, les nTreg isolés *ex vivo* sont anergiques *in vitro*, i.e. non-prolifératifs et ce même

après stimulation de leur TCR. En effet, ces cellules sont incapables de produire par elles-mêmes les cytokines nécessaires à leur prolifération et notamment l'IL-2. De façon très intéressante, mes travaux montrent que le VHC lève l'état d'anergie des nTreg en induisant leur prolifération et ce dès 24 hpi. Des expériences approfondies ont également révélées que le VHC induisait une signalisation cellulaire conduisant à l'expression de cytokines et de facteurs de prolifération tels que l'IL-2, IL-4, IL-2-Rα, IL-15 et Bcl-6. J'ai d'ailleurs pu valider à 48 hpi, une augmentation de la sécrétion de l'IL-2 par les nTreg infectés. Ce dernier résultat conforte l'hypothèse selon laquelle le VHC modifie profondément le phénotype et la fonction des nTreg.

Les nTreg infectés favorisent l'inflammation hépatique

De nombreuses équipes ont étudié l'infiltrat immunitaire dans les foies infectés par le VHC et leurs résultats ont révélé une corrélation positive entre la fréquence élevée des cellules Th17 (sécrétrices d'IL-17) et la sévérité de l'inflammation hépatique. Par ailleurs, d'autres études ont montré que les Treg étaient dotés de propriétés de plasticité. En effet, en fonction de l'environnement cytokinique et du stimulus, les Treg peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires Th1, Th2 ou Th17. Mes résultats montrent que les nTreg infectés expriment également un ensemble de marqueurs associés à ces différents profils inflammatoires, aussi bien Th1, Th2 que Th17. Cette observation a pu être confortée par la mise en évidence de l'augmentation de la sécrétion des cytokines IFN-γ, IL-2 et IL-17. Ceci suggère que les nTreg infectés pourraient potentialiser l'inflammation hépatique, ainsi

conduisant à un recrutement plus important des nTreg afin de restaurer l'homéostasie tissulaire.

En conclusion, l'ensemble de mes travaux montre pour la première fois que le VHC est capable d'interagir directement avec des Treg humains et de potentialiser leur phénotype régulateur et leur fonction suppressive. Cette propriété du VHC pourrait, en partie, expliquer les mécanismes par lesquels le virus échappe au contrôle du système immunitaire et favoriser ainsi la progression de l'hépatite C vers la cirrhose et le CHC (Figure 1). Dans une perspective thérapeutique, réussir à lever l'action du VHC sur les Treg pourrait contribuer à améliorer la réponse aux traitements.

RÉFÉRENCES

- 1 Gavin MA et al 2002. Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺suppressor T cells *in vivo*. *Nature Immunol* 3:33-41.
- 2 Carpentier A et al 2009. Increased Expression of Regulatory Tr1 Cells in Recurrent Hepatitis C after Liver Transplantation. *Am J Transplant* 9: 2102-2112.
- 3 Sakaguchi S et al 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21:1105-1111.
- 4 Delhem N et al 2008. Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. *Bulletin of Cancer* 95: 1029-1038
- 5 Ouaguia L et al 2013. Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *ISRN Hepatology* Vol 2013 Article ID 928485, p7.
- 6 Murphy DG et al 2007. Use of Sequence Analysis of the NS5B Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C/E1 and 5' Untranslated Region Sequences. *J Clin Microbiol* 45: 1102-1112.
- 7 Stenard F et al 2014. CD49b, a major marker of regulatory T-cells type 1, predicts the response to antiviral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *BioMed Research International* Vol 2014, ID 290878, p9.
- 8 Dhumeaux D et al 2014. Rapport de recommandations 2014 : Prise en charge des personnes infectées par les virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C. Éditions EDK/Groupe EDP Sciences. p510.
- 9 Bolacchi F et al 2006. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4⁺ T cell response in HCV infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 144:188-196.
- 10 Molina S et al 2008. Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* 82:569-574.

RÔLE DE NF-KB DANS LA BIOLOGIE DES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS CD4⁺FOXP3⁺ À L'ÉTAT BASAL

**Emilie Ronin
Angéline Rouers
Audrey Baeyens
Benoit Salomon**

**UPMC UMRS CR7, Inserm U1135,
CNRS ERL 8255,
Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris**

ronin.emilie@hotmail.fr

3

Ce prix du meilleur poster de la thématique «Immune System Development and Regulation» a été attribué grâce au soutien financier de la Ligue contre le Cancer

ARTICLE 8 et 9 (ABSTRACTS)

Laurissa Ouaguia , Journal of viral Hepatitis, 2013 et 2014

1-

O114

In vitro infection with HCV increases the suppressive phenotype and activity of the human regulatory T cell

L Ouaguia¹, O Morales¹, M Sénéchal¹,
C Wychowski², A Carpentier³, L Aoudjehane⁴, Y
Calmus⁴, Y de Launoit¹, F Conti⁴ and N Delhem¹
¹CNRS UMR 8161, Institut de biologie de Lille, Lille, France, ²Inserm
U1019-CNRS UMR8204- Centre d'Infection et d'immunité de Lille,
Lille, France, ³National Institute of Health (NIH), Bethesda, USA,
⁴UPMC Université Paris 06 & INSERM, UMR_S 938, CdR
Saint-Antoine, Paris, France

BACKGROUND AND AIMS: Hepatitis C virus (HCV) infection is characterized by a high risk of chronicity, which may progress to cirrhosis and hepato-cellularcarcinoma. We have shown that natural regulatory T cell (Treg) play an important role in this disease progression and are associated with the severity of the HCV recurrence after liver transplantation. In this context, one essential question remains to know whether HCV infection could alter Tregs function thus promoting liver pathogenesis.

METHODS: Tregs were isolated from blood of healthy donors and infected with HCVcc/JFH-1. Internalization of HCV protein was confirmed by immunofluorescence and western-blotting. Expression of several cell markers associated to Treg phenotypic and function was analyzed using flow cytometry and Q-PCR. The Treg activity is evaluated by suppression tests (MLR) and correlated with cytokines secretion profile by ELISA.

RESULTS: We showed that infected Treg significantly increases the expression of virus receptors and that HCV

proteins (Core, NS5A) are well internalized. We also showed that HCV infection promotes the Treg proliferation and probably the recruitment of infected Treg by infected liver cells. In addition, HCV infection potentiates the 'suppressive phenotype' of Treg showing a significant increase of markers associated with their phenotype and immunosuppressive function. These results were correlated with increased suppression activity and increased secretion of immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF- α).

CONCLUSION: This work showed for the first time that HCV is able to infect human Treg and promote their recruitment and suppressive activity, contributing to one mechanism by which HCV could escape the immune system thus leading to a worsening of the disease.

O115

Assessing the role of intra-familial transmission in the ongoing propagation of the Egyptian hepatitis C virus epidemic

L Maxwell and A Nandi McGill University, Montreal, Canada

PURPOSE: Egypt has the highest global prevalence of HCV. The Egyptian government campaign to control schistosomiasis with parenteral tartar emetic, the source of Egypt's current HCV epidemic, ended in 1986. Recent studies have investigated risk factors associated with ongoing transmission of HCV and used the 2008 Egypt Demographic and Health Survey (DHS) to assess ecologic risk factors (1, 2). This study adds to recent work by merging the 2008 DHS Health Issues and biomarker datasets to examine evidence of intra-familial transmission (IFT) of HCV and by using

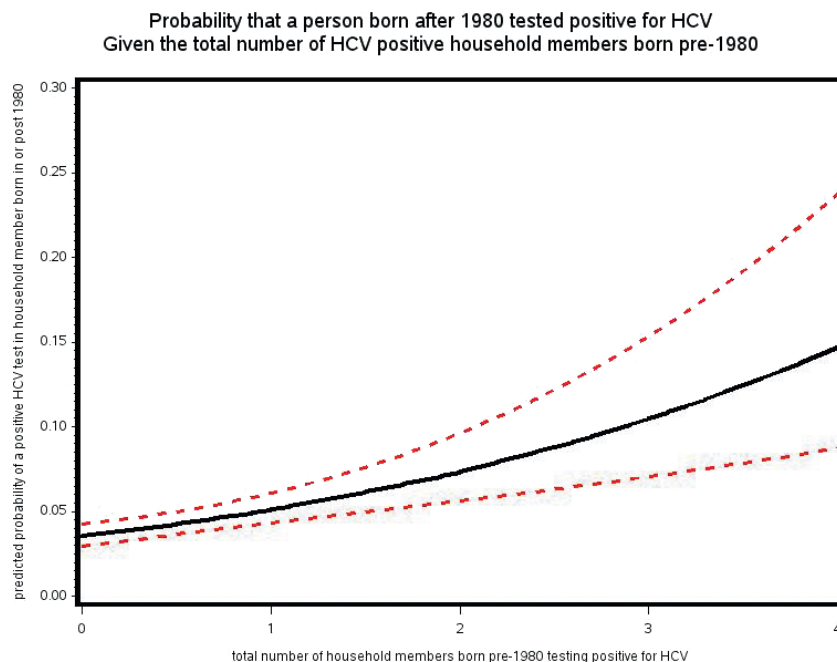


Fig. 1 xxxxxx

O313**How do we treat acute HCV when we don't have any trial data?**

H Wedemeyer *Hanover Medical School, Hanover, Germany*

Treatment of acute hepatitis C with pegylated interferon alfa is well established. Randomised treatment trials evaluating optimal timing of therapy (Deterding, *Lancet Infectious Diseases* 2013) and duration or the need of ribavirin combination therapy (Santantonio, *Hepatology* 2014) have been published during the last 18 months. Overall, treatment can be delayed for up to 3 months after the onset of symptoms without impairing the likelihood to respond to therapy. 12 weeks of PEG-IFN α monotherapy may be sufficient and the addition of ribavirin is not needed, most likely also in the setting of HIV-HCV coinfection. Very importantly, monoinfected patients can be treated with high response rates of >80–90% even without new direct acting antivirals. Thus, if patients have no contraindications against IFN α , this treatment will remain the first treatment option in most cases. If IFN α therapy fails, IFN-free therapies with new DAAs can still be applied once the patient has progressed to early chronic hepatitis C.

New direct acting antivirals have not been studied systematically in acute hepatitis C. A case series in HIV-positive individuals with acute hepatitis C investigated the efficacy of triple therapy with PEG-IFN α , ribavirin and telaprevir suggesting slightly higher response rates than historical controls not receiving an HCV protease inhibitor. However, DAAs in combination with PEG-IFN α will most likely be clinically irrelevant in future. Patients should either receive PEG-IFN α alone or IFN-free therapies. The question to be answered by future clinical trials is what the optimal treatment duration with a potent IFN-free combination is in patients with acute hepatitis C. Trials exploring 6 weeks of therapy are currently ongoing.

O314**HCV contributes to the aggravation suppressive activity of natural regulatory T cells and induces the emergence of type 1 regulatory T cells**

L Ouaguia¹, O Morales¹, C Wychowski², A Carpentier³, L Aoudjehane⁴, J Dubuisson², Y Calmus⁵, Y de Launoit¹, F Conti⁵ and N Delhem¹

¹CNRS UMR 8161 Biology Institute of Lille, Lille, France, ²Inserm U1019-CNRS UMR8204- Centre d'Infection et d'immunité de Lille,

Lille, France, ³National Institute of Health (NIH), Bethesda, USA,

⁴UPMC Université Paris 06 & INSERM, UMR_S 938, Paris, France,

⁵AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Pôle Digestif, Centre de

Transplantation Hépatique, Paris, France

Infection with the hepatitis C virus (HCV) is characterized by a high risk of chronicity, which may progress to cirrho-

sis and development of hepatocellular carcinoma (HCC). We have shown in a previous work that natural and induced human regulatory T cells (nTreg and Tr1) play an important role in the progression of hepatitis C to HCC and are associated with the severity of viral recurrence after liver graft transplantation (1,2). However, nothing is known concerning the specific impact of HCV on these two regulatory T cell sub-populations. Our hypothesis is that HCV may promote the recruitment of regulatory T cells in the infected liver, and alter their phenotype and suppressive activity for the progression of liver pathogenesis. Treg cells were isolated from PBMC and infected *in vitro* with HCVcc. The suppressive activity of Treg and Tr1 was assessed by RT-QPCR, IF, WB, ELISA and FACS. Our result showed that Treg infection with HCV significantly increases the expression of viral receptors and that the viral proteins (NS5A, Core, E1 and E2) are internalized into Treg. Interestingly, we also showed that viral infection raises the Treg anergy and promotes the recruitment of infected Treg cells by HCV-infected hepatocytes and primary intrahepatic fibroblasts. In addition, HCV infection induced a significant increase in the expression of markers associated with Treg cells (CD4, CD25, GITR, FOXP3...), thus potentiating their 'suppressive phenotype.' These results are correlated with the functional analysis of infected Treg cells, showing (i) a significant increase in the expression of markers associated with their suppressive activity (IL-10, TGF- β 1, IL-35, Tbet, FAS, PD1, Granzyme B...), (ii) a significant increase in the secretion of immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF- β 1) and (iii) an increase in immunosuppressive function (MLR). Finally, we have shown that HCV promotes conversion of conventional T lymphocytes into induced T regulatory type 1 cells. This study shows for the first time that HCV can be able to be internalized into human Treg cells and could promote Treg recruitment into the infected liver. Moreover, the fact that HCV can potentiate the suppressive function of nTreg and favor the induction of Tr1 may contribute to explain the mechanisms by which HCV escapes the immune system and promotes the progression of hepatitis C to cirrhosis and HCC.

REFERENCES

1. Ouaguia L, Morales O, Mrizak D, et al. Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *ISRN Hepatology* Volume 2013 (2013): Article ID 928485.
2. Ouaguia L, Morales O, Sénéchal M, et al. *in vitro* infection with HCV increases the suppressive phenotype and activity of the human regulatory T cell. *Journal of Viral Hepatitis* 2013;20(s3):3.

1- COMMUNICATIONS-CONGRES

Oral Communications (11):

- 2014:** - The Viral Hepatitis Congress 2014. Frankfurt, Germany, October 9-11th 2014.
- The CAFOBIOs journey on hepatitis at Dschang University. Cameroon, July 16th 2014
 - 14th André Verbert symposium EDBSL. Lille, France, September 11th, 2014.
- 2013:** - 73th AFEF conferences. Lille, France, October 2-5th, 2013.
- The Viral Hepatitis Congress 2013. Frankfurt, Germany, September 26-28th, 2013.
 - The 3rd Heidelberg Forum for Young Life Scientists. Heidelberg, Germany, June 6-7th, 2013.
 - The 13th ARNS meeting on hepatitis. Paris, France, January 24-25th, 2013.
 - The CNRS-UMR8161 Seminars. France, 2012/2013/2014/2015.

Poster communications (12):

- 2015:** - The EASL – ILC 2015. Vienna, Austria, April 22-26th, 2015.
- 2014 :** - Annual SFI congress of 2014. Lille, France, November 4-6th, 2014.
- The Viral Hepatitis Congress 2014. Frankfurt, Germany, October 9-11th, 2014.
 - The 74th AFEF conferences. Lille, France, September 24-26th, 2014.
 - The 7th CNO conferences. Deauville, France, May 14-16th, 2014.

- The 7th French International conference on HIV/Hepatitis. France, April 27-28th, 2014.

2013: - The Viral Hepatitis Congress 2013. Frankfurt, Germany, September 25-27th, 2013.

- The 15th international congress of immunology -ICI. Milan, Italy, August 22-27th, 2013.

- The 18th edition of N.A.T conferences. Nantes, France, June 24-25th, 2013.

- The 6th CNO conferences. Deauville, France, May 15-17th, 2013.

2012 : - The EASL/AASLD conference. Prague, Czech Republic, September 14-16th, 2012.

- The 5th CNO conferences. Deauville, France, May 10-11th, 2012.

2- PRIX ET RECOMPENSES OBTENU(E)S

- 2015:** - **Young Investigator Fellowship EASL-ILC** for my participation to the International Liver Congress (Vienna, Austria, April 22-26th 2015)
- 2014:** - **Jury Award ROCHE-SFI** of the best Poster presentation for my participation to the annual French society of immunology (Lille, France, November 4-6th, 2014).
- **Jury Award MT180 seconds** of the best oral presentation for my participation to the regional competition of My thesis in 180 seconds (Lille, France, March 8th, 2014).
 - **Public Award MT180 seconds** of the best oral presentation for my participation to the regional competition of My Thesis in 180 seconds (Lille, France, March 8th, 2014).
 - **Young Investigator Fellowship VHC** for my participation to the international viral hepatitis congress (Frankfurt, October 9-11th 2014).
 - **Young Investigator Award AFEF** for my participation to the 75th scientific conferences of French Association of the study of the liver (Paris, France, September 24-26th, 2014).
 - **Young Investigator Fellowship CNO** for my participation to the 7th scientific congress of Canceropole nord-ouest (Deauville, France, May 14-16th, 2014).
- 2013:** - **Jury Award CNO** of the best Poster presentation for my participation to the 6th scientific congress of Canceropole nord-ouest (Deauville, France, May 17th, 2013).
- **Young Investigator Fellowship CNO** for my participation to the 6th scientific congress of Canceropole nord-ouest (Deauville, France, May 15-17th, 2013).

- **Young Investigator Fellowship VHC** for my participation to the international viral hepatitis

congress (Frankfurt, September 26-28th, 2014).

- **Young Investigator Fellowship ICI** for my participation to the international congress of immunology (Milan, Italy, August 22-27th, 2013).

2012: - **Young Investigator Fellowship EASL/AASLD** for my participation to the European Association for the Study of the Liver on hepatitis C therapy (Prague, Czech Republic, September 14-16th 2012).

- **Young Investigator Fellowship CNO** for my participation to the 5th scientific congress of Canceropole nord-ouest (Deauville, France, May 10-11th, 2012).

3- FORMATIONS DOCTORALES

A- CONSTRUIRE SON PROJET PROFESSIONNEL D'APRES THESE

Au cours de ma troisième année de thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à la formation doctorale « Construire son Projet Professionnel d'après Thèse » anciennement connu sous le nom de « *Nouveau Chapitre de la Thèse* (NCT) ». Cette formation est proposée par l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille, le collège doctoral Nord de France et l'Association Bernard Grégory (ABG-Intelli'Agence). Elle a pour but d'aider les futurs Docteurs à valoriser leur compétences au cours de la thèse (Gestion de projet, expertises scientifiques et technologiques, Management de l'innovation, veille, communication, Formation et management pédagogique, etc.).

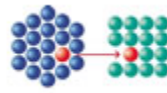
Cette formation se déroule à raison de 4 demi-journées de rencontres en groupe d'étude + environ 4h de rencontres individuelles avec le formateur. Le formateur ou mentor est un spécialiste en R&D issu du milieu professionnel. Mon mentor a été Serge Bossut, anciennement chef du département des ressources humaine chez Naruto et actuellement à la retraite. L'objectif de ces réunions était d'essayer de dégager ensemble les compétences que nous avons pu acquérir ou révéler au cours de notre doctorat. Au terme de cette formation, j'ai été amené à présenter la valorisation de mes compétences dans un rapport écrit et devant un jury composé des membres du collège doctoral, des cadres et des responsables du monde industriel.

Cette formation m'a permis de prendre du recul afin d'envisager plus sereinement un avenir professionnel. En effet, j'ai pu appréhender ma thèse comme un projet et j'ai ainsi pu constater qu'un grand nombre des compétences et expertises acquises au cours de la thèse sont parfaitement transférables dans d'autres domaines que la recherche publique. Avoir connaissance de cela me permet d'aborder, avec plus de confiance et de sérénité, le monde de l'entreprise

Vous trouverez dans le document ci-dessous, le mémoire de cette formation. Ce mémoire est scindé en 4 différentes parties : 1- présentation des cadres et enjeux de la thèse, 2- gestion de la thèse en mode projet, 3- présentation des compétences développées et 4- présentation de mon projet professionnel.



L'intelli'agence



Association Bernard Gregory
De la thèse à l'emploi

VALORISATION DES COMPETANCES-CONSTRUIRE SON PROJET PROFESSIONNEL D'APRES THESE

Laurissa OUAGUIA, Jeune Chercheur en Biologie

Mail: ouaguialaurissa@yahoo.fr Tel: 0033 (0) 6 18 43 39 99

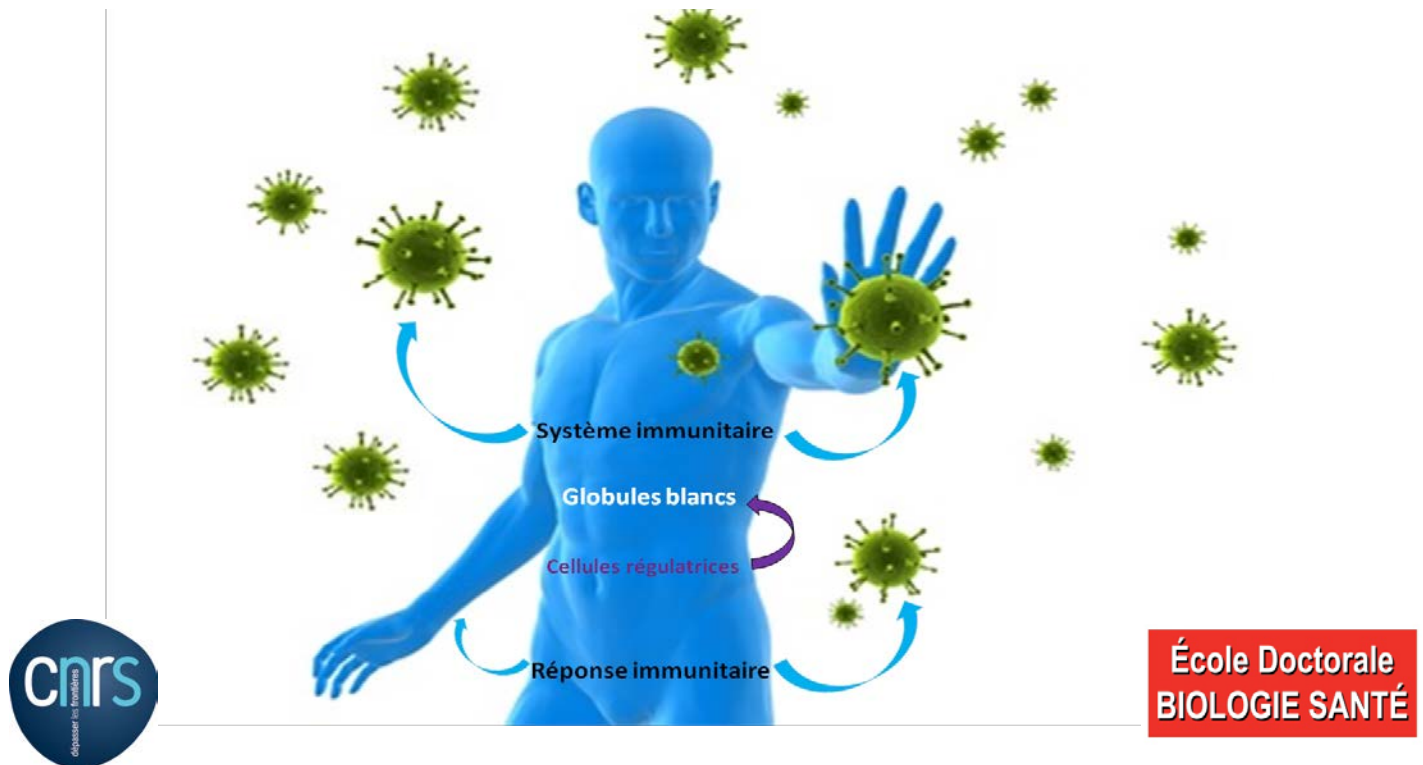
CNRS UMR 8161 Institut de Biologie de Lille



Mentor : Serge BOSSUT



Quel est le rôle des « cellules traîtres » appelées lymphocytes T régulateurs dans l'hépatite C ?



Sujet académique provisoire : Le virus de l'hépatite C contribue à l'aggravation de l'environnement immunosuppresseur en augmentant l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs humains

Directeur de thèse : Dr. Nadira DELHEM

Date de soutenance de thèse : 16 Octobre 2015

Date de présentation orale : 23 juin 2015

1- Ma Thèse : Cadre général et Enjeux

Contexte scientifique et objectif de recherche : L'infection par le Virus de l'hépatite C (VHC*) se caractérise par un risque élevé de chronicité, pouvant évoluer vers la cirrhose du foie et vers le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC[†]). En cas d'infection, le système immunitaire va activer le bouton ON et les globules blancs seront massivement recrutés afin de lutter contre le virus, notamment à travers les mécanismes inflammatoires. Une fois le pathogène éliminé et afin d'éviter une exagération de la réponse inflammatoire, le système immunitaire appuie sur le bouton OFF et recrute les cellules régulatrices tels que les lymphocytes T régulateurs (Treg[‡]) dont la fonction est d'éliminer les globules blancs en excès. Pour échapper à la réponse immune, certains pathogènes détournent le système immunitaire et activent directement les cellules régulatrices. Les Treg sont donc des cellules de mauvais pronostic dans la plupart des infections car ils peuvent supprimer les réponses immunitaires antivirales. Dès 2002, des premières études ont mis en évidence le rôle majeur des Treg dans la chronicité de l'infection liée au VHC. Plus récemment, des travaux menés au sein de l'équipe ont montré que les Treg jouaient un rôle important dans la progression de l'hépatite C vers le CHC après la primo-infection et dans la sévérité de la récurrence virale du greffon après une transplantation hépatique (TH[§]).

Dans ce contexte, les principaux objectifs de mon projet sont d'évaluer si les Treg pourraient aggraver l'inflammation hépatique retrouvée dans l'hépatite C chronique ce qui favoriserait la progression de la pathologie vers le cancer du foie. L'impact spécifique du VHC sur Treg humains n'ayant pas encore été élucidé, nous pensons que la présence des Treg pourrait contribuer à expliquer la persistance virale, la carcinogenèse et la récurrence virale après TH. Il n'existe pas de vaccin contre l'hépatite C et si notre hypothèse est confirmée, mes travaux contribueraient à associer des médicaments pour bloquer les Treg dans les traitements de l'hépatite C. Cette association favoriserait une meilleure prise en charge et donc la survie des patients.



Evolution de l'infection par le virus de l'hépatite C

Intérêt du travail : L'ensemble de mes résultats montrent que le VHC est capable d'interagir directement avec des lymphocytes T régulateurs humains et que ce virus augmente leur activité régulatrice. Mes travaux montrent également que le VHC favorise l'apparition de nouvelles cellules régulatrices induites à partir des globules blancs et l'abondance de ces cellules régulatrices pourrait favoriser la persistance de la maladie.

Enjeux scientifiques, sociétaux et économiques : Les enjeux de cette thèse sont très importants dans la mesure où ce travail s'inscrit dans une démarche de recherche visant à aider le patient. En effet, la mise en évidence d'un impact direct du VHC sur les lymphocytes T régulateurs humains, qui sont systématiquement

* Virus de l'hépatite C

† Carcinome hépatocellulaire

‡ Lymphocytes T régulateurs

§ Transplantation hépatique

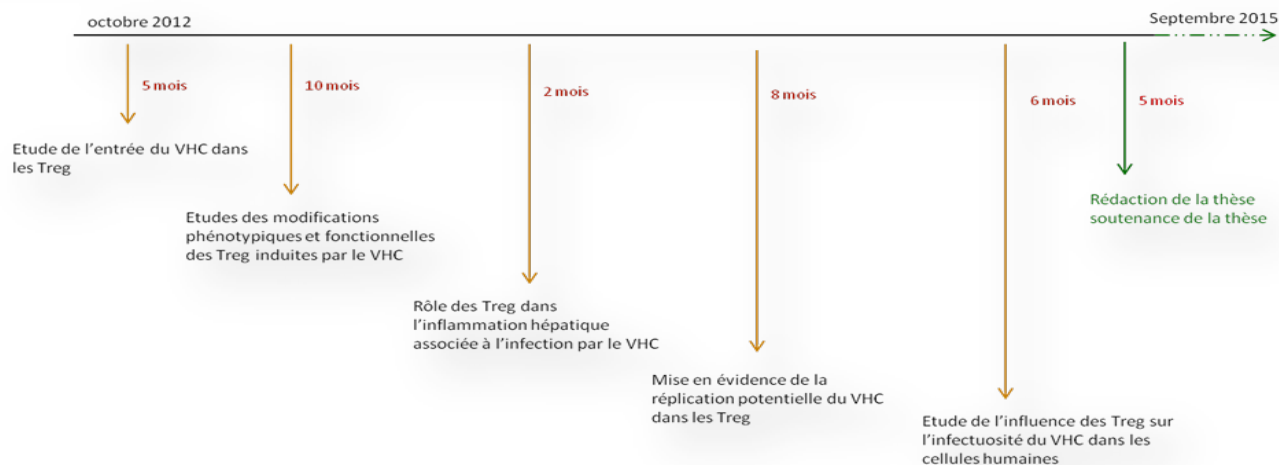
associés à un mauvais pronostic dans les CHC, laisse entrevoir des perspectives hautement intéressantes en terme thérapeutique.

Mes motivations : L'envie de faire une thèse de doctorat est venue confirmer une motivation ancienne et une passion ancrée pour tout ce qui est en relation avec la recherche. J'ai toujours été conquise par la Biologie, l'Immunologie, la microbiologie, notamment lorsque des sujets comme le corps humain, la santé et les physiopathologies étaient abordés. Après mon Master, différents sujets de thèse m'ont été proposés mais un seul m'a personnellement touché : celui associant hépatite C et le système immunitaire. En effet, je suis originaire du Cameroun qui, selon des sources épidémiologiques, est le 3^{ème} pays le plus touché au monde par l'hépatite C (près de 14% de la population). Les traitements couramment prescrits sont les molécules DAA de 2^{ème} génération et l'accès aux nouveaux traitements ne se fera pas avant des dizaines d'années. Cette thèse, très axée sur la médecine fondamentale et sur l'amélioration des traitements, me donnait l'opportunité de faire de la recherche transversale, d'intérêt public. Par ailleurs, le challenge d'apprendre à gérer un projet dans son ensemble en intégrant les contraintes financières, de temps, humaines, matérielles, m'a séduit et conquis. D'autre part, l'aspect multidisciplinaire du sujet qui m'était proposé, me permettait d'élargir mes compétences pour la suite de ma carrière.

Environnement de travail : j'effectue ma recherche au sein de L'unité mixte de recherche CNRS 8161 dont les recherches sont axées sur l'étude des cancers, virologie, la chimie des tumeurs et l'immunothérapie. Au sein de cette unité, ma thèse s'inscrit dans la compréhension des mécanismes d'échappement des cancers au système immunitaire et dans l'étude des interactions Virus/Hommes.

2- Ma thèse : une gestion de projet

Déroulement de la thèse et difficultés: Ma thèse de doctorat a officiellement débutée le 01 octobre 2012 mais j'ai commencé à préparer mon travail de recherche dès août 2012. En effet, j'ai tout d'abord étudié le sujet sur lequel je devais travailler en faisant de la veille bibliographique et technologique ; en m'appropriant les travaux antérieurs de l'équipe et en évaluant la concurrence nationale et internationale, afin de savoir ce qui avait déjà été fait, ce qui restait à faire et dans quelle dimension s'inscrirait mon travail. Les premiers mois effectifs de ma thèse ont été mis à contribution pour poursuivre de mes travaux de veille technologique et bibliographique tout en me familiarisant avec les techniques et appareils nécessaires à la réalisation de mon projet. Ainsi, j'ai pu profiter de l'expertise et de l'expérience de collaborateurs plus anciens qui m'ont formée à la préparation et à la réalisation des expériences, à l'analyse des données et à l'interprétation des résultats obtenus. Avec le soutien de mon directeur de thèse et grâce au travail de veille effectué, j'ai pu proposer un projet de recherche détaillé avec un échéancier prévisionnel pour 3 ans. J'ai ensuite présenté ce projet en réunion d'équipe dans un premier temps puis il a été présenté devant les responsables d'équipes avec lesquelles nous collaborons. Après relecture et discussion, mon projet de thèse portant sur « l'impact des Treg dans la progression de la pathologie associée à l'infection par le VHC » a été adopté. (Voir la représentation schématique ci-dessous).



Représentation schématique de mon projet de thèse tel que prévu en octobre 2012

Le VHC étant un virus hautement pathogène, sa manipulation a nécessité 40h de formation en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (LNSB3). Or certaines expérimentations nécessitent de sortir de ce confinement sécurisé pour des salles moins protégées. Il a fallu assurer l'innocuité des échantillons sortis, assurer la sécurité du virus lors du transport et la sécurité des personnes fréquentant le bâtiment. J'ai donc rédigé un document sur l'ensemble des protocoles et manipulations que je serai amenée à utiliser au cours de ma thèse. De plus, le caractère hautement dangereux de mon matériel de travail m'a obligé à passer des tests d'aptitude afin d'obtenir un certificat d'aptitude médicale pour la manipulation de ce virus. Par ailleurs, je suis obligée de faire des analyses médicales très régulièrement afin de m'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination professionnelle. Lors de la réalisation de mes expériences, j'ai essuyé plusieurs échecs, comme par exemple, dans la mise en évidence la réplication potentielle du VHC dans les Treg, avec le soutien de mon directeur de thèse, nous avons réorienté l'objectif N°4 de mon projet de thèse pour finalement étudier si le VHC pouvait favoriser le recrutement intra hépatique des Treg ce qui aggraverait l'environnement immunosuppresseur. Par ailleurs, j'ai également rencontré des problèmes d'ordre technique tels que : mauvaise qualité des produits utilisés, pannes d'appareils, erreur d'expérimentation, défaut de résultats interprétables, ce qui a considérablement allongé mon planning prévisionnel. Une fois que les résultats obtenus ont été validés statistiquement et qu'ils ont été suffisants, j'ai alors pu présenter mes travaux dans des congrès nationaux et internationaux en communications orales (11) et en communications affichées (13). Par ailleurs, j'ai aussi rédigé 2 articles en anglais qui ont été publiés dans des journaux scientifiques internationaux. De façon hebdomadaire, la chef d'équipe qui est ma responsable scientifique anime des réunions où sont présentés les points d'avancement des travaux. Au cours de ces réunions, je présente mes résultats qui sont discutés puis je présente le planning des futures expériences et ainsi que leur faisabilité (temps, moyens humains et financiers), Ces réunions collectives permettent une réflexion mutuelle dans le groupe, aussi bien sur mon projet que sur les autres projets, ceci permet donc d'avoir un « regard neuf » sur les résultats avec la possibilité d'avoir des propositions de réorientation du sujet par les autres membres de

l'équipe. Par ailleurs, les points d'avancement scientifiques sont également réalisés de façon bimensuelle avec nos collaborateurs.

L'Equipe et les Collaborations: Le laboratoire dans lequel je réalise ma thèse est situé au sein de l'institut de Biologie de Lille dans l'Unité Mixte de Recherche CNRS 8161, en partenariat avec l'Université de Lille et l'Institut Pasteur de Lille. L'équipe IRCV** que j'ai rejoint pour réaliser ce projet travaille sur la compréhension des mécanismes d'immunorégulation des Cancers Viro-induits. Cette équipe est dirigée par le Dr Nadira Delhem. Elle est constituée de 2 chercheurs, 1 chirurgien hospitalier, 3 ingénieurs d'étude, 1 post-doctorant, 2 doctorants, 1 technicien et 2 Master2R et ponctuellement des stagiaire que nous accueillons. Chaque membre de l'équipe porte un projet bien défini et le mien consiste à étudier les interactions entre le virus de l'hépatite C et les lymphocytes T régulateurs humains. Pour mener à bien ce projet, j'ai bénéficié des différentes compétences scientifiques et techniques mises à ma disposition. En effet, j'ai eu la chance d'être encadrée par le Dr Nadira Delhem, qui possède une expérience reconnue sur les mécanismes immunitaires d'immunorégulation et sur les pathologies associées au VHC. Par ailleurs l'Institut de Biologie de Lille et l'Institut Pasteur de Lille offrent un accès libre à de nombreux appareils et moyens techniques tels que différents systèmes de microscopie, cytométrie de flux, culture cellulaire, LNSB3^{††}, etc. qui facilitent les expérimentations. En outre, les accords signés avec les hôpitaux d'une part et l'EFS^{‡‡} d'autre part, ainsi que notre étroite collaboration avec les cliniciens, me permettent d'avoir accès à du matériel humain pour mes recherches mais surtout, il me permet de mieux appréhender le versant médical de mon travail de recherche. L'organisation et la réalisation de mon projet de recherche s'appuie sur la compétence de 2 équipes de recherche clinique (l'une dirigée par le Pr Yvon Calmus et l'autre par le Pr Philippe Mathurin), et d'une équipe de recherche fondamentale (dirigée par le Pr Jean Dubuisson), équipes avec lesquelles le laboratoire collabore déjà depuis quelques années. Notre étroite collaboration avec les cliniciens et la collaboration avec l'équipe fondamentale me donne accès des outils et des infrastructures indispensables à la réalisation du projet (voir liste des collaborateurs en annexe 1).

Evaluation du coût du projet : Le matériel de travail, les consommables, les salaires et les déplacements constituent les parts les plus importantes de dépenses. Les calculs de coût en matériel et déplacements sont des valeurs moyennées (chaque expérimentation ou voyage étant différent). Les salaires sont ceux mentionnés dans la grille de salaire CNRS en fonction des postes occupés et de l'ancienneté. Les frais d'infrastructure (électricité, eau, gaz, ventilation, etc.) sont obtenus en divisant le coût total du bâtiment par le nombre d'employés afin d'obtenir un coût par personne. Le coût total de ma thèse s'élève à environ 400 000 euros et les détails sont dans le tableau présentés en annexe 2.

** Immunorégulation des Cancers Viro-induits
†† Laboratoire de sécurité Biologique de Niveau 3

3- Ma thèse : un développeur et révélateur de compétences

Au cours mes années de doctorat, ma responsable scientifique m'a accordée sa confiance et la liberté de décision dans la définition et la gestion de mon projet, tant au niveau de la programmation des expérimentations que dans l'évolution à donner au sujet. La réalisation de ce projet m'a permis de développer ou de révéler de nombreuses compétences telles que :

- les savoirs-faires techniques transférables : gestion de projet et de budgets, conduite du travail, administration, vulgarisation, communication en langue étrangère, etc.
- Les savoir-être transférables : l'autonomie, la rigueur, la prise de décision, l'écoute, la pédagogie, etc.
- Les compétences transverses : Collaboration, veille scientifique et technologique, etc.
- Compétences techniques et scientifiques: Expérimentation, etc.

La réalisation de ce doctorat m'a donc apportée de nombreuses compétences, tant au niveau professionnel qu'au niveau personnel. Le tableau simplifié regroupant les compétences développées est présenté en annexe 3. Seules les compétences essentielles au pilotage d'un projet ont été développées ci-après.

a- Expertises acquises :

- **Expertise Scientifique pluridisciplinaire:** Durant ces 3 années de recherche, j'ai pu approfondir mes connaissances en biologie cellulaire et moléculaire et plus particulièrement en immunologie, virologie, oncologie, inflammation et immunorégulation des cancers. Grâce à cette formation, j'ai acquis un champ d'expertise prioritaire en biologie cellulaire, immunologie, infections virales, cancérologie, interaction hôte-pathogène, inflammation, lymphocytes T régulateurs, physiologie et biochimie. Par ailleurs, j'ai aussi pu développer d'autres champs secondaires d'expertise en biologie moléculaire, biotechnologies, phytopharmacologie, hépatologie et en glycobiologie structurale et fonctionnelle.
- **Expertise technique pluridisciplinaire:** (i) **en Biologie Cellulaire** : Utilisation des microscopes optiques et électroniques, isolement et culture des cellules immunitaires humaines (lymphocytes T, monocytes, cellules NK, lymphocytes B, ...), les techniques d'Infections virales, test de prolifération, de viabilité et de suppression cellulaire (radioactivité), isolement et purification de nanovésicules, culture et manipulation des lignées cellulaires cancéreuses (Huh7); (ii) **en immunologie** : phénotypage (caractérisation) cellulaire par cytométrie de flux (membranaire, intracellulaire), tests immunologiques (ELISA), analyses protéiques (western blot, immunofluorescence); (iii) **en biologie moléculaire** : PCR quantitative en temps réel, études transcriptomiques, extraction ARN, design des amorces; (iv) **en protéomique** : technique de résonance magnétique nucléaire, chromatographie à haute performance en phase liquide, lyophilisation produits, acquisition et analyse des spectres, biochimie; et (v) **en biologie animale** : expérimentation animale et mise sur pied d'un modèle d'artériosclérose, phyto-pharmacologie et évaluation de la toxicité d'une plante médicinale.

De plus, tout au long de ces années de recherche, j'ai appris à travailler avec des composés dangereux (radioactivité, produits chimiques, toxiques et cancérigènes, utilisation des virus, manipulation du sang humain potentiellement contaminé). La manipulation de ces ressources nécessitait le respect méticuleux des règles d'hygiène et de sécurité (protocoles de manipulation) et des règles d'éthique (réglementation sur l'utilisation de produits dérivés de l'Homme). Ainsi, j'ai développé des compétences transversales en hygiène et sécurité.

b- Compétences et savoir-faire transférables :

- **Gestion et réalisation de projet** : Pour réaliser mon projet de thèse, j'ai défini les ressources nécessaires (humaines, matérielles, financières, temps, etc.) à court terme pour une expérience, ou à moyen et long terme dans l'évolution du projet et son cadrage sur 3 années. Cette méthode de travail prévisionnelle m'a ainsi permis de prendre du recul afin d'acquérir une vision globale et stratégique du projet ce qui me permettait de gérer les priorités. Gérer ce projet a nécessité une grande autonomie dans l'évaluation et la planification des expériences, mais également de la persévérance et de l'anticipation dans la gestion des problèmes rencontrés. En effet, j'ai dû gérer des problèmes techniques, financiers ou relationnels pendant ma thèse et cette gestion m'a apporté des compétences sur l'esprit d'équipe et dans le management du personnel. J'ai également dû gérer le budget et la conduite totale du projet.
- **Gestion et management de l'innovation** : Certains objectifs de mon projet ayant évolué au fil du temps, cette évolution m'a demandé une veille scientifique et technologique régulière, de part la lecture de la bibliographie scientifique internationale, et des discussions avec les différents partenaires (collaborateurs, commerciaux). Par ailleurs, tout au long de ma thèse, il a également fallu négocier avec les différents fournisseurs de produits et kits nécessaires à mes recherches, le but étant d'obtenir les meilleurs tarifs pour les meilleurs produits.
- **Communication scientifique** : La communication et la valorisation de mon travail lors de réunions scientifiques en groupe restreint ou en congrès auprès d'un public spécialiste ou non averti, ont constitué une étape essentielle de mon projet. J'ai exposé mes travaux à plusieurs reprises, lors de congrès nationaux (français) et internationaux (anglais), sous la forme de présentations orales (12) ou communications écrites (13) à l'occasion de 25 congrès scientifiques nationaux et internationaux. J'ai également eu l'occasion de participer à des manifestations rassemblant des doctorants de divers horizons scientifiques « Journées André Verbert » : avec la présentation des travaux des doctorants de 2^{ème} année de thèse de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé ; Concours de vulgarisation en français « MT180 secondes » dont j'ai été la gagnante de la région Nord-Pas-de-Calais ; le concours de vulgarisation en anglais « FAMELAB » dont j'ai été finaliste régionale, une formation pour la présentation de mes travaux en anglais « English Practice makes perfect », une formation pour énumérer les compétences tirées de ma thèse « construire son projet professionnel d'après thèse », etc. La vulgarisation et la pédagogie ont alors été essentielles pour véhiculer et valoriser les résultats de mes recherches, auprès d'un public non-spécialiste. Au cours de ma thèse, j'ai pratiqué la rédaction et la synthèse en français et en anglais : résumés en vue d'une sélection de congrès, courriels aux partenaires pour les tenir informés de l'avancée de mes travaux ou leur demander des conseils, demandes de financement, demandes

d'outils techniques à d'autres équipes nationales et internationales. La rédaction d'articles scientifiques et de revues sont les éléments constituant la partie la plus importante de l'exercice de rédaction que j'ai réalisé. Ces articles scientifiques ont été publiés dans des journaux scientifiques de renommée internationale.

- **Compétences linguistiques** : de part mes déplacements pour les différentes présentations de mes travaux lors de congrès et symposiums scientifiques, et de part la rédaction d'articles scientifiques, j'ai dû me familiariser avec différentes langues étrangères. La langue anglaise étant la langue des sciences, la majorité de mes communications a été préparée et effectuée en anglais. Par ailleurs j'ai aussi participé à la rédaction de 3 articles scientifiques en anglais. En outre, de part mes déplacements professionnels, je possède quelques notions en italien et en allemand même si l'anglais reste la 2^{ème} langue étrangère que je maîtrise le mieux.
- **Informatique** : la réalisation et l'analyse de mes résultats m'ont permis d'acquérir diverses compétences en informatique sur les logiciels suivants : Sigma Stat, MXpro3005, Flow JO, ImagJ, Axivison, Zen, Endnote, Coral Draw, Topsin MultiGauge, Ascent software et Microsoft office.
- **Formation et management pédagogique**: Au cours de ces années de doctorat, j'ai été la responsable scientifique et technique de 6 stagiaires sur des durées allant de 1 mois à 7 mois. Ces stagiaires avaient des profils très variés : d'étudiants en BTS à étudiant en Master 2. J'ai dû gérer leurs emplois du temps et je leur ai confié des « missions » selon leur niveau d'études. Je les ai également accompagnés dans la préparation de leur mémoire ainsi que dans leur soutenance de stage. Par ailleurs, j'ai eu l'opportunité de dispenser des cours à l'université de Lille1 dans les domaines de la biologie et de la biochimie à raison de 64h/an. J'ai ainsi la tâche de préparer les séances de travaux pratiques et de corriger les copies des comptes rendus et d'examens. L'ensemble de ces encadrements et formations m'a permis de développer des compétences en pédagogie, sur l'écoute et la transmission de connaissances. Ces expériences m'ont également permis d'améliorer mon adaptabilité face à un public au niveau d'étude et à l'expérience professionnelle.

c- Compétences transverses :

- **Travail en équipe, Collaboration**: Dès mon arrivée dans l'équipe dirigée par le Dr. Nadira Delhem, Je me suis rapidement intégrée au groupe et j'ai activement participé à la vie du laboratoire : (i) en terme d'organisation (gestion des commandes, des stocks, des délais de livraison et des relations avec les agents commerciaux pour négocier les prix des produits et obtenir des offres d'achats) ; (ii) sur le plan scientifique et technique, en intervenant régulièrement dans les projets de mes collègues, soit en tant que renfort technique mais plus particulièrement pour des conseils scientifiques et techniques dans leurs expérimentations. Cette entraide fait partie intégrante du travail d'équipe et est nécessaire à la mise en place d'un environnement de travail agréable. Par ailleurs, les personnes désireuses de réaliser des expériences en immunologie se sont souvent tournées vers moi afin d'obtenir des conseils techniques et scientifiques sur la méthodologie à adopter et m'ont parfois demandé de réaliser les expériences pour eux (entreprises). Cette utilisation de mes compétences a été pour moi le point de départ de la création de collaborations et de réseaux scientifiques diversifiés.

- **Création d'un réseau professionnel** : J'ai participé au renforcement de la collaboration avec les cliniciens, qui ont ainsi intégré mon projet. De plus, je suis membre actif de différents réseaux scientifiques que sont **BIOADDOCT** (association des docteurs et des doctorants en biologie santé du nord- de France), **SFI** (société Française d'immunologie), **AFFEF** (Association Française pour l'étude du foie) et membre de l'EASL (European Association for the Study of the Liver).

d- Les aptitudes et qualités : Savoir-être

En outre, j'ai développé au cours de ma thèse de doctorat un savoir-être qui peut être transférable : travail d'équipe, autonomie, rigueur, audace, patience, persévérance, confiance en soi, dynamisme, motivation, esprit d'équipe, curiosité scientifique, passion et engagement au travail, esprit critique, gestion du stress, négociation de prix, écoute, collaboration, direction de stage, etc.

e- Les Méta-compétences :

- **Capacité d'adaptation** : Suite à des difficultés techniques ou financières que j'ai rencontrées au cours de ma thèse, j'ai dû faire preuve d'adaptation afin de réorienter mon travail.
- **Capacité d'apprentissage** : Par ailleurs, au fur et à mesure que mon projet avançait, j'ai dû apprendre de nouvelles techniques expérimentales afin d'être à la pointe de la technologie ce qui a permis de garder mes travaux dans le registre de l'innovation.

4- Projet professionnel

Mon projet professionnel serait de devenir chef de projet R&D dans une entreprise pharmaceutique ou Enseignant-Chercheur dans un laboratoire universitaire. En effet, les diverses compétences scientifiques et transférables développées m'ouvrent différentes possibilités d'emploi.

Dans un premier temps, je recherche un poste de « **chef de projet R&D en immunologie et oncologie** » dans une entreprise pharmaceutique. Ce projet professionnel m'est d'autant plus proche que durant ma thèse j'ai principalement développé et mis sur pied des techniques d'immunologie et d'immunologie des cancers. Par ailleurs, au début de ma thèse, j'ai travaillé pour une entreprise pharmaceutique pour laquelle j'avais en charge la réalisation des tests immunologiques afin de tester de nouvelles molécules thérapeutiques. Pour réaliser ce projet, je me suis inscrite sur différents sites en ligne de recrutement des scientifiques dans l'entreprise et d'ailleurs, j'ai déjà répondu à une annonce de GILEAD qui recherche un scientifique en immunologie et oncologie. Actuellement, je scrute les différentes offres d'emploi proposées dans diverses entreprises telles que Servier, Gilead, Roche, etc...

En parallèle, je recherche un **PostDoc en immunologie, interaction hôte-pathogène et Cancers**. En effet, je n'écarte pas la possibilité de faire de la recherche dans le monde académique. A cet effet, j'ai activé mon réseau professionnel et fait savoir aux différents protagonistes que je suis à la recherche d'un PostDoc. Par ailleurs, je dépose des candidatures spontanées dans des laboratoires français ou étrangers où mes compétences pourraient être recherchées. *In fine*, je pourrais devenir Enseignante-Chercheur à l'université. Pour réaliser ce projet, je peux me targuer d'avoir déjà eu une expérience dans l'enseignement universitaire. En effet, j'ai profité de mes années de doctorat pour avoir l'opportunité de dispenser des cours à l'université de Lille1. Bref, l'ensemble des compétences développées (gestion de projet, gestion d'équipe, etc...) reste transférable dans d'autres domaines du marché de l'emploi et cette formation doctorale m'a aidé à en prendre conscience.

Conclusion

Gérer mon projet de thèse est une expérience très enrichissante, tant sur le plan scientifique et professionnel que personnel. En effet, cette thèse m'a permis d'apprendre et de découvrir de nombreuses choses sur moi et sur mes capacités à mener à bien un projet, travailler en équipe, mais surtout gérer une équipe de travail (stagiaires, techniciens), gérer les priorités et les imprévus (expériences qui ne fonctionnent pas, gestion financière, pannes de matériels, ...), organiser et planifier son emploi du temps méthodiquement et rigoureusement, mais surtout organiser les emplois du temps des autres, gérer quelques mésententes entre les membres dans l'équipe, etc. Par ailleurs, j'ai pu participer à différentes formations doctorales qui m'ont ouvert d'autres opportunités d'avenir professionnel. En effet, bon nombre des compétences et expertises développées sont parfaitement transférables dans des domaines autres que la recherche publique. Avoir connaissance de cela me permet de m'ouvrir, avec plus de confiance et de sérénité, vers le monde de l'entreprise. De plus, j'ai été très surprise par le montant total de ma thèse avoisinant les 400 000 euros.

« Savoir qu'une somme aussi importante a été mise entre mes mains, de façon indirecte ou directe, m'a fait comprendre que je suis capable de gérer un projet tant au niveau financier que dans sa réalisation ».

Annexe 1

ORGANIGRAMME DES COLLABORATEURS

Les Membres de L'UMR8161/ Equipe 6: Immuno-Régulation des Cancers Viro- induits (IRCV)

Dr Nadira Delhem

Dr Véronique Pancré

Dr Olivier Moralès

Dr Emmanuel Boleslawski

Dr Dhafer Mrizak

Technician Chantal Samson

PhD student Ramee Mustapha

M2R Samah Sfaxi

Igr Céline Ingelaere

Igr Hamza Aboussemdaï

M2R Sarah Renaud



UMR 8204: CIIL - Equipe HCV

Dr Jean Dubuisson

Dr Czeslaw Wychowski

Dr Karine Séron

Dr Sandrine Belousard

Dr Laurence Cocquerel



Hôpital Saint-Antoine (Paris) :

Pr Yvon Calmus

Dr Filoména Conti

Pr Olivier Scatton

Dr Lynda Aouhedjane

Khaldoun Ghazal

Dr Clément Barjon



Hôpital Huriez CHRU (Lille) :

Pr Pierre Desreumaux

Pr Philippe Mathurin

Pr Sébastien Dharancy



BioImaging center Lille



Annexe 2

Coût Personnel

Personnel	Salaire brut mensuel	Charges mensuelles	×36 mois	Coéf	Total
Doctorante	2 600	3 640	131 040	1	131 040
Directeur de these CNRS	5 390	7 518	270 648	1/5	54 129
Ingénieur d'étude CNRS	3 398	4 757	171 259	1/20	8 562
Entretien des locaux	2 000	2 800	100 800	1/20	672
Secrétaire administrative	2 600	3 640	131 040	1/15	1 872
Sécrétaire comptable	2 600	3 640	131 040	1/15	1 872
Ingénieur formateur 1	3 398	4 757	171 259	1/1000	171.26
Ingénieur formateur 2	3 398	4 757	171 259	1/5	3 425
Collaborateurs	3 300	4 620	166 320	1/10	16 632
Total					218 478

Coût Consommables

Consommables	Prix d'achat	nombres	Coéf	Total
Papier, cahier	107	3	1	321
Stylo, marqueurs	10	12	1	120
Kits Treg	990	40	1	39 600
Kit CD4+	700	10	1	7 000
Ficoll, colonnes	1 125	40	1	45 000
Tubes, Tampon, milieu, autres	45 000		1/7	6 428
Anticorps	700	20	1	14 000
Gels	135	60	1	8 100
Total				120 569

Coût Batiment

Laboratoire	montant	Coéf	Total
Loyer bâtiment Electricité, Eau, gaz Entretien, gardienage, Autres charges	500 000	1/150	3 333

Coût Vulgarisation du travail

	Nombre	coût	Coéf	Total
Déplacements professionnels (congrès internationaux, séminaires, réunions)	23	540	1	12 600

Coût Matériels

Appareils	Prix d'achat	Charge /an	× 3ans	amortissement	Coéf	Total
Ordinateurs bureau	700	140	420	5ans	1	420
Ordinateurs personnels	1 200	240	720	5 ans	1	720
Cytomètre calibre	80 000	16 000	48 000	5 ans	1/70	960
Cytométrie canto	85 000	17 000	51 000	5 ans	1/70	1 020
Maintenance calibre	5 000				1/70	100
Maintenance canto	14 000				1/70	280
Logiciel flowjo	1 000				1/70	20
Logiciel zen	6 500				1/70	130
Logiciel sigmastat	1 000				1/70	140
Microscopes						6 400
Total						10 190

Coût Formations

Formations	Montant	Coéf	Total
Hygiène et sécurité	3 425	1	3 425
Construire son projet professionnel de thèse	700	1	700
English makes perfect	700	1	700
MT180s	700	1	700
Salles blanches	3 425	1	3 425
Microscopies, cytométrie	3 425	1	3 425
Autres formations	700	1	700
Total			13 075

Coût Documentation

Documentation	montant	coef	total
Articles / revues scientifiques	1 600	1	1 600
Posters	240	1	240
Bibliothèque numérique	-	-	-
Total			1 840

Coût total de la thèse: environ **380 085** Euros

NB: le coût des ressources numériques n'est pas pris en compte car abonnement géré par le CNRS.

Annexe 3

Compétences développées	Transférables?
Expertise scientifique (immunologie, cancérologie,)	oui
Expertises techniques (Biologie cellulaire, Isolement et caractérisation des cellules humaines,...)	oui
Gestion et réalisation de projet (gestion budget, gestion temps,...)	oui
Gestion et management de l'innovation (Veille scientifique, veille technologique,...)	oui
Communication et vulgarisation (présentation ppt)	oui
Compétences linguistiques (Anglais courant, notion d'Allemand)	oui
Compétences informatiques (Pack office, Statistiques, ..)	oui
Formation et management pédagogique	oui
Travail en équipe	oui
Collaboration	oui
Création d'un réseau professionnel	oui/non
Savoir être (autonomie, pugnacité, dynamisme,.....)	oui
Capacité d'adaptation (adapter technique et méthodes aux besoins, ...)	oui
Capacité d'apprentissage	oui
Rédaction rapport d'activité	oui
Négociation avec les fournisseurs	oui
Organisation d'évènements ou de manifestations	oui
Rédaction du livret de sécurité pour expérimentation	oui

A- FAMELAB

Au cours de ma troisième année de thèse, j'ai eu l'opportunité de participer au concours de vulgarisation en langue anglaise « FAMELAB ». Ce concours est organisé par l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille et le British Council. Il est basé sur le même principe que le concours MT180s car il donne l'opportunité aux scientifiques de divers horizons de vulgariser leurs travaux en langue anglaise.

Durant notre préparation personnelle, nous avons été accompagnés par le responsable Famelab du nord Olivier Moreau.

L'objectif de cette formation était de permettre aux scientifiques de vulgariser leur travaux en anglais et ce devant un public non averti. Le jury était composé de scientifiques et de journalistes. Ce concours m'a permis de compter les 11 finaliste de la région Nord Pas de Calais.

Par ailleurs, ce concours m'a permis d'adapter mon propos scientifique afin de le rendre compréhensible de tout public. En outre, c'était l'occasion d'améliorer son anglais conversationnel notamment lors de la préparation ou lors des réponses aux questions.

Participer au concours Famelab m'a également donné beaucoup de visibilité tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. En effet j'ai eu l'occasion de donner diverse interview. D'ailleurs, la vidéo de présentation est disponible sur Youtube dont le lien est le suivant <https://www.youtube.com/watch?v=hpykmE6UI2k>.

Vous trouverez dans le document ci-après, la forme écrite du discours de vulgarisation de mes travaux en anglais présenté lors de ce concours.

Hi everyone and thank you so much for having me. I have a question for you:

Did you know that each of us has over 42 Billion of white blood cells in our body? These cells are small soldiers of our Immune System responsible for defending the body against any attack, whether it is internal or external such as Viruses. White blood cells are therefore the army of our body while viruses are microscopic organisms that are for the most part Harmful to the body. When you are infected with a virus, the immune system will press the button ON and the Soldier cells will massively and rapidly migrate to the site of infection to fight in an unbelievable war. In most cases, our soldier cells are victorious and we healings. However, in some cases, viruses come out winners and the disease worsens.

For a long time, many scientists have sought to understand why in two persons, yet infected with the same virus, soldiers cells can triumph in one, while in the other, the virus can take over. Yeah, I know what you think: researchers who seek, we find but researchers who find we seek. I admit it is not totally wrong. However, some researchers had sniffs and they give us a very interesting explanation. (Trust me, it is interesting). Indeed, they described a small population of "traitors cells" within soldiers cells: these are regulatory cells. These regulatory cells represent the button OFF of the immune system and they are responsible for decreasing the excess activity of soldiers cells mainly to prevent this latter from attacking healthy tissues of our body. Very interestingly, it has been described that some viruses, such as hepatitis C virus, can hijack the immune system to directly activate the button OFF. Hence, by destroying the soldiers cells, regulatory cells work without knowing for the virus and thus for the worsening of the disease. My Thesis was born.

The goal of my thesis is therefore to study the different interactions between the Hepatitis C virus and the regulatory cells and I'm looking at the impact of this interaction on the disease progression. In fact, I've been able to show that the hepatitis C virus had the ability to hold on regulatory cells and that this virus dramatically increased the killing activity of regulatory cells. At the end of my thesis, I wish I could describe all the direct mechanisms that hepatitis C virus use to hijack the immune system and thus taking into account these discoveries in the present or future treatment may, I hope, improve the response and thus the survival of patients.

B- MA THESE EN 180 SECONDES

Au cours de ma deuxième année de thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à la formation doctorale « Ma thèse en 180 secondes ». Cette formation est proposée par l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille, le Centre National de la Recherche Scientifique et la Conférence des Présidents d'Université (CPU-CNRS). Elle a pour but de familiariser les Doctorants aux techniques de vulgarisation scientifiques pour le grand public.

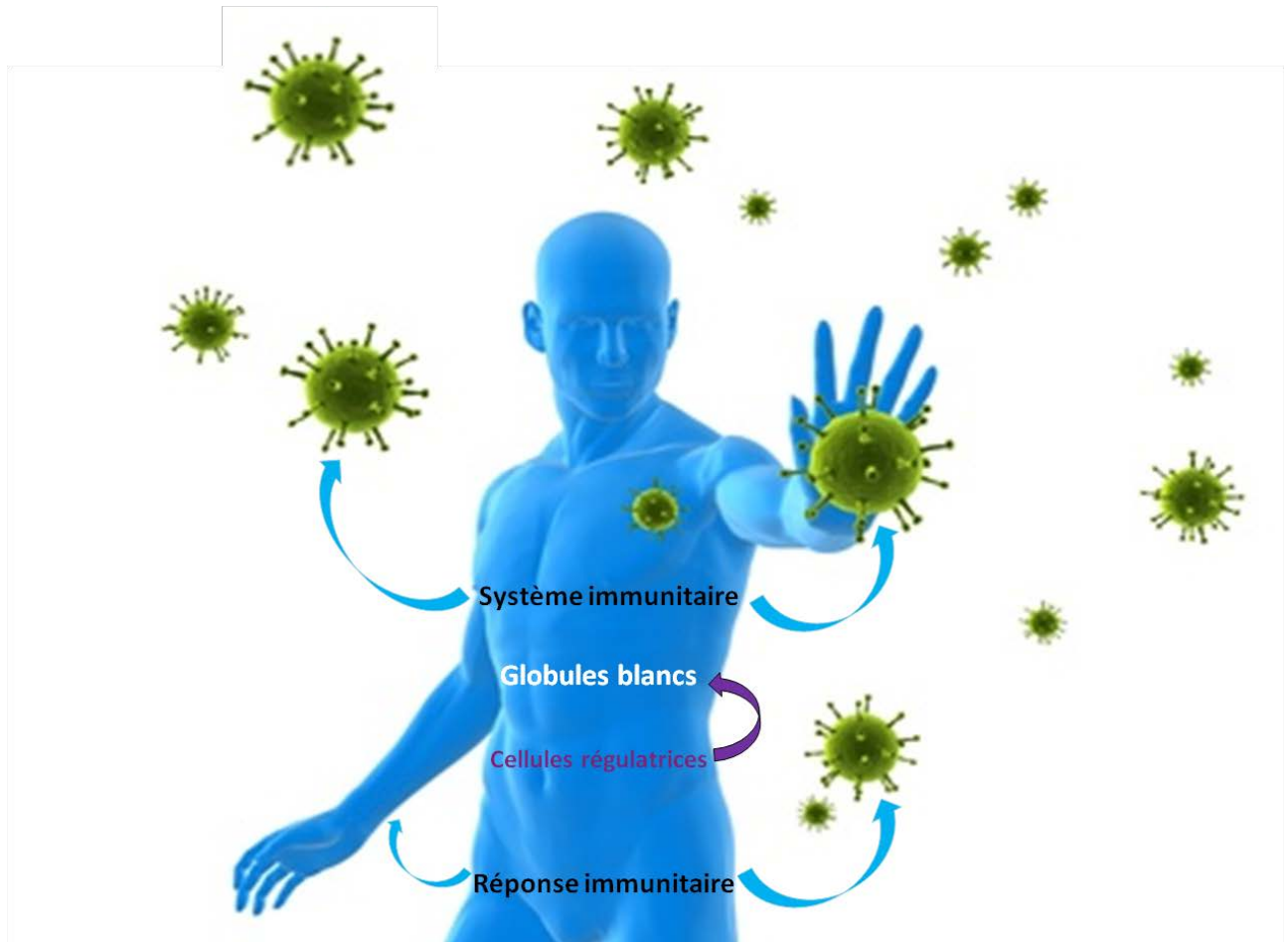
Cette formation se déroule à raison de 2 journées de rencontres avec les autres participants et formateurs au forum des sciences de Villeneuve d'Ascq. Les formateurs sont des spécialistes de la communication et de la vulgarisation pour le grand public. Mes formateurs ont été Géraldine Besson, Nathalie Laspina et Frédéric Luginsland.

L'objectif de cette formation était d'initier les doctorants à diverses techniques de vulgarisations à travers des mises en situations, des jeux de rôle et jeux de diction. Au terme de cette formation, nous avons participé à un concours Régional dont le but était de présenter ses travaux de thèse en 3 minutes devant un public non spécialiste. Le jury était composé de 2 scientifiques, 2 journalistes et 2 cadres d'entreprise. Lors de ce concours, j'ai reçu, à la fois, le prix du jury et le prix du public pour la meilleure présentation orale. Par ailleurs, j'ai été sélectionné en tant que finaliste pour représenter la région Nord Pas de Calais à la finale nationale de ce concours, qui s'est tenu à Lyon en présence de la secrétaire nationale attaché à la recherche Geneviève Fioraso.

Cette formation m'a permis par la suite, d'expliquer plus simplement mes travaux de thèse aux personnes que je côtoie régulièrement. Par ailleurs, ce concours m'a fait connaître dans la communauté scientifique et universitaire. J'ai été soutenu dans cette aventure par les formateurs et par la direction de l'EDBSL : le Pr Bernard Sablonnière et Pr Philippe Delannoit. Par ailleurs, j'ai donné diverses interviews dans les journaux télévisés, papiers ou radio (Canal+, M6, Lille TV, Wéo, CNRS-CPU MT180s, France Inter, 20 Minutes, Nord-Eclair, La voix du Nord, La Croix, etc.)

Vous trouverez dans le document ci-après, l'image utilisé pour le concours MT180s ainsi que le discours de vulgarisation de mes travaux présenté lors de ce concours.

Virus de l'hépatite C, globules blancs et cellules régulatrices



Discours de Vulgarisation MT180s

Savez vous que chacun de nous possède plus de 42 Milliards de Globules Blancs dans le sang? Ces globules blancs sont des petites cellules de notre Système Immunitaire chargés de défendre l'organisme contre toutes les agressions, qu'elles soient intérieures ou extérieures : comme c'est le cas des Virus. Les globules blancs représentent donc les Soldats de notre corps alors que les virus sont des organismes microscopiques qui sont pour la plus part Néfastes pour l'organisme.

Lorsque vous êtes infecté par un Virus, le système immunitaire va appuyer sur le bouton ON et les Cellules Soldats vont se diriger massivement et rapidement vers le lieu d'infection et là va se livrer une guerre sans merci. Dans la plus part des cas, les cellules soldats sortent vainqueurs du combat et vous guérissez. Mais, Cependant, Dans certains cas, ce sont les virus qui prennent le dessus et donc, la maladie s'aggrave.

Depuis longtemps, de nombreux scientifiques ont cherchés à comprendre mais pourquoi chez deux personnes, pourtant infectés par le même virus, les cellules soldats pouvaient triompher chez l'un, tandis que chez l'autre, le virus pouvait prendre le dessus. Bon Je sais, vous vous dites : des Chercheurs qui cherchent, on en trouve mais des chercheurs qui trouvent, on en cherche ce qui, je le reconnais, n'est pas totalement faux. Néanmoins, certains chercheurs ont eu du flair car nous tenons aujourd'hui une piste d'explication très intéressante.

En effet, il a été décrit une petite population de « cellules traîtres » au sein même des cellules soldats : ce sont les cellules régulatrices. Ces cellules régulatrices représentent le bouton OFF du système immunitaire et sont chargées d'éliminer le surplus des cellules soldats principalement afin d'éviter que ces dernières n'attaquent les tissus sains du corps humain. De façon très intéressante, il a aussi été montré que certains virus, comme le virus de l'hépatite C, pouvaient détourner le système immunitaire pour activer le bouton OFF. Et Ainsi, en détruisant les cellules soldats, les cellules régulatrices travailleront sans le savoir, pour le compte du virus et donc pour l'aggravation de la maladie. Mon Sujet de thèse était né.

L'objectif de Ma thèse consiste donc à étudier les différentes interactions entre le virus de l'Hépatite C Et les cellules Régulatrices et je regarde l'impact de cette interaction sur la Progression de la maladie. D'ailleurs, j'ai déjà pu montrer que le virus de l'hépatite C avait la capacité de s'Accrocher aux cellules régulatrices et que ce virus augmentait de façon très importante le pouvoir Destructeurs des cellules régulatrices. Avant la fin de ma thèse, j'aimerais pouvoir décrire les mécanismes directs que le virus de l'hépatite C utilisent pour détourner le système immunitaire et donc, la prise en compte des ces paramètres dans les traitements actuels ou futurs pourra, je l'espère, améliorer la réponse et donc la survie des patients.

C- ENGLISH PRACTISE MAKES PERFECT

Au cours de ma deuxième année de thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à la formation doctorale « English Practice Makes Perfect ». Cette formation est proposée par l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille. Elle a pour but de familiariser les Doctorants aux méthodes de présentations des travaux scientifiques dans les congrès internationaux.

Cette formation se déroule à raison de 2 heures par semaines pendant environ 4 mois lors de rencontres avec les autres participants, dans les locaux de l'école doctorale. J'ai eu la chance d'être formée par le Dr Julie Kerr-conte, chercheur d'origine américaine.

L'objectif spécifique de cette formation était d'initier les doctorants aux techniques de présentations scientifiques en anglais, à travers des mises en situation et divers exercices. Au terme de cette formation, nous avons participé à une séance filmée durant laquelle chaque doctorant devait présenter, en 5 min et en anglais, son travail de thèse et répondre aux questions des autres participants. A l'issue de cette présentation, les vidéos étaient visionnées en groupe afin que chacun puissent améliorer sa posture, son expression ou son langage.

Cette formation a été particulièrement bénéfique aux diverses présentations en anglais de mes travaux lors des nombreux congrès scientifiques auxquels j'ai pu participer (plus de 20 congrès nationaux et internationaux).

La grande majorité de ces présentations s'est d'ailleurs soldée par l'obtention de prix ou de bourse. Les différents congrès auxquels j'ai eu l'opportunité de participer sont listés dans la partie II des annexes : communications-congrès.

Nous ne sommes savants que de la science présente.

Michel Eyquem de Montaigne

ABSTRACT

HCV infection is characterized by a high risk of chronicity which may progress into cirrhosis and HCC. At this irreversible stage, the only efficient treatment remains liver transplantation. Unfortunately, cirrhosis C-transplanted patients display high risks of liver graft re-infection by HCV. Many studies attributed the chronicity of HCV to different reasons such as virological characteristics. However, we and others have attributed the worsening of the disease, in part, to regulatory T cells whether they are natural (nTreg or Treg) or induced (Tr1, TH3). In previous work, the team described an increased frequency of Treg and Tr1 in periphery and at intra-hepatic levels in transplanted patients. We also described an important recruitment of Treg cells in the aggravation of liver fibrosis into cirrhosis and HCC. Hence, the history of HCV seems to be closely related to Treg cells. It is known that Treg cells can increase chronic infections by inhibiting antiviral immune responses. However, Treg cells could also play a negative role by interacting directly with the virus. To date, the specific impact of HCV on the two regulatory populations (Treg and Tr1) has not yet been understood. In this context, the fundamental issues of my thesis project is to assess (i) whether HCV uptakes can promote the recruitment of Treg cells to the infected liver and change their phenotype and suppressive activity in favor of the worsening liver disease; (ii) whether HCV uptakes by Treg cells may contribute to the increase of liver inflammation found in chronic hepatitis C and (iii) whether HCV uptakes can favor the emergence of induced regulatory T cells from conventional T cells.

In the first part of my thesis, I highlighted an increased frequency of intra-hepatic nTreg and Tr1 during the progression of the liver disease to cirrhosis and HCC. This suggests a key role of Treg cells in the worsening liver disease. Moreover, the recruitment of these Treg could be a predictor of worsening liver damage.

In the second part of my work, I analyzed the HCV entry and internalization into Treg cells. Indeed, I have shown that HCV is able to interact directly with human Treg cells, potentiating their regulatory phenotype, increasing their suppressive function and stimulating their proliferation *in vitro*. My work also shows for the first time that HCV uptakes significantly increase Treg cells recruitment to the infected liver. Furthermore, I analyzed the impact of HCV uptakes on the worsening of liver inflammation by Treg cells. Interestingly, my results showed that HCV uptakes may lead to the secretion of many pro-inflammatory factors and cytokines by Treg cells, thus can promote the development of liver damage and therefore the chronicity of the disease.

In the third part of my thesis, I studied the impact of HCV infection on the conversion of conventional T cells into induced regulatory T cells. My results showed that HCV uptakes may favor the emergence of iTreg population capable of suppressing the proliferation of other immune cells. Hence, these iTreg may potentiate the immunosuppressive environment and could promote the progression of liver disease.

To conclude, my findings strongly suggest that HCV can potentiate the immunosuppressive environment by promoting intra-hepatic recruitment of natural regulatory T cells, increasing the Treg cell phenotype and potentiating their suppressive activity. Very interestingly, my results also showed that HCV uptakes may promote hepatic inflammation by Treg cells. Finally, HCV seems to favor the emergence of new regulatory populations from convT lymphocytes. Taken together, these results strongly suggest that HCV increases the hepatic immunosuppressive environment and this may explain, at least partly, how the HCV escapes from the immune response and the worsening of the pathology towards the development of hepatocellular carcinoma.

RESUME

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est caractérisée par un risque élevé de chronicité pouvant évoluer vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). A ce stade, le seul traitement efficace reste la transplantation d'un foie sain. Malheureusement, les patients transplantés pour cause de cirrhose C sont exposés à un risque très élevé de réinfection virale du greffon. La chronicité de l'infection par le VHC est liée à des raisons multifactorielles, telles que le génotype du virus, les caractéristiques de l'hôte ou l'altération des défenses immunitaires. En effet, de nombreuses études, dont les nôtres, ont impliquées les lymphocytes T régulateurs qu'ils soient naturels (nTreg ou Treg) ou induits (Tr1, TH3) dans la progression de la pathologie hépatique. Ainsi, les travaux du laboratoire ont décrit un recrutement important de ces 2 sous-populations au cours de l'évolution de la fibrose hépatique vers le CHC, et une augmentation de leur prévalence chez des patients transplantés présentant une récurrence virale sévère. L'histoire du VHC semble donc étroitement liée aux Treg. Or, s'il est décrit que les Treg peuvent supprimer les réponses immunitaires effectrices antivirales, rien n'est connu sur une éventuelle interaction entre les T régulateurs et le virus. Dans ce contexte, Les enjeux de ma thèse ont été (i) de conforter le recrutement des T régulateurs chez un patient chroniquement infecté par le VHC et suivi sur une période de 18 ans, (ii) d'évaluer si le VHC pouvait directement interagir avec le Treg, en induisant une modification de leur phénotype, de leur anergie, de leur fonction ou de leur recrutement par des cellules du foie infectées par le VHC, et enfin (iii) d'identifier si le VHC était susceptible d'induire la conversion de T régulateurs à partir lymphocytes T conventionnels.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence, chez un patient infecté par le VHC, une augmentation de la prévalence intra-hépatique des nTreg et des iTreg, corrélée à la progression vers la cirrhose et le CHC. Cette étude a permis de mettre en évidence un rôle clé des Treg dans l'aggravation de la pathologie hépatique associée au VHC, suggérant que leur recrutement pourrait représenter un facteur prédictif de l'aggravation des dommages au foie.

La deuxième partie de mon travail avait pour objectif de mettre en évidence une interaction directe du VHC avec les Treg. Ainsi, mes travaux ont montré pour la première fois que le VHC était capable (i) d'internaliser les lymphocytes Treg humains, (ii) de potentialiser leur phénotype régulateur, (iii) d'accroître leur fonction suppressive, (iv) de stimuler leur prolifération *in vitro* et (v) d'induire la sécrétion de nombreux facteurs et cytokines pro-inflammatoires, pouvant favoriser le développement des lésions hépatiques et donc la chronicité de la maladie. J'ai également montré que le VHC favorisait le recrutement des Treg naturels humains vers le foie infecté .

Dans la troisième partie de ma thèse, j'ai évalué l'impact du VHC sur la conversion des lymphocytes T conventionnels en lymphocytes T régulateurs induits. Mes résultats semblent montrer que le VHC favorisait l'émergence de population iTreg capables de supprimer la prolifération des cellules immunitaires, suggérant que ces iTreg potentialiseraient l'environnement immunosuppresseur et favoriseraient la progression de la pathologie hépatique.

En conclusion, L'ensemble de mes résultats montre que le VHC favorise l'installation d'un environnement immunosuppresseur en favorisant le recrutement intra-hépatique des Treg naturels et en augmentant leur phénotype et leur activité suppressive. Par ailleurs, le VHC semble favoriser l'émergence de nouvelles populations régulatrices à partir de lymphocytes Tconv. Ainsi, en favorisant l'instauration d'un environnement immunosuppresseur, le VHC pourrait contribuer à l'échappement de la maladie au système immunitaire et donc à l'aggravation de la pathologie hépatique.