

Université de Montréal

**Infection des cellules dendritiques périphériques du sang  
par le virus de l'hépatite C**

Par

Ian Gaël Rodrigue-Gervais

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M.Sc.)  
en microbiologie et immunologie

Mai 2005

© Ian Gaël Rodrigue-Gervais, 2005



W

4

U58

2005

v. 129

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Infection des cellules dendritiques périphériques du sang  
par le virus de l'hépatite C

Présenté par :  
**Ian Gaël Rodrigue-Gervais**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur :	Hugo Soudeyns
Directeur de recherche :	Rafick-Pierre Sékaly
Co-directeur de recherche :	Daniel Lamarre
Membre du jury :	Alain Lamarre

Mémoire accepté le : \_\_\_\_\_

## RÉSUMÉ EN FRANÇAIS ET MOTS CLÉS

### Résumé

L'existence d'un réservoir qui exercerait une pression inhibitrice sur la fonction des dendritiques sanguines est une hypothèse marginalisée mais dont l'étude peut donner des indices concernant les mécanismes qui sous-tendent l'échec des lymphocytes T VHC-spécifiques à éradiquer l'infection chez l'être humain. Nous montrons dans cette étude que les dendritiques contiennent les plus hauts niveaux d'ARN du VHC de toutes les sous-populations sanguines analysées. Ce résultat souligne leur rôle en tant que l'un des sites réservoirs préférentiels du virus dans la périphérie. Aussi, dans les mêmes individus infectés, l'expression conjointe d'IL-12 et de TNF $\alpha$  est inversement proportionnelle aux niveaux de molécules d'ARN du VHC détectées, tandis qu'aucune perte d'expression n'est observée dans les cas séropositifs qui se définissent par l'absence du génome viral dans leur PBMC. Par ailleurs, la fréquence en dendritiques circulantes n'est réduite que de deux fois chez ces patients. Ces variations fonctionnelle et numérique se traduisent en une diminution forte des niveaux d'IL-12p40 et de TNF $\alpha$ . Toutefois, nos données suggèrent qu'il y a un défaut intrinsèque dans les dendritiques, même avant que celles-ci disparaissent de la périphérie. De plus, les changements dans les fréquences rapportées peuvent en fait provenir de leur relocalisation due à l'inflammation engendrée par l'infection plutôt que d'une déplétion viro-induite. Cette conclusion est soutenue par le fait que la distribution sanguine du sous-type monocytaire CD14<sup>low</sup>16<sup>+</sup> n'est pas altérée par le VHC, en contraste avec la baisse observée pour le sous-type inflammatoire CD14<sup>hi</sup>16<sup>-</sup>. Ces observations renforcent la notion que la désensibilisation dose-dépendante des TLR est directement reliée aux niveaux d'ARN du VHC dans les dendritiques hôtes. Ainsi, cette étude fournit une position alternative à celle proposée par plusieurs auteurs qui négligent le rôle que les dendritiques ont à jouer dans l'orchestration de la réponse immunitaire anti-VHC. Ces travaux contribuent à notre compréhension des mécanismes par lesquels l'hôte peut se défendre contre le VHC.

### Mots clés

PBMC, dendritiques sanguines, VHC, TLR, cytokines inflammatoires, IL-12

## RÉSUMÉ EN ANGLAIS ET MOTS CLÉS

### Summary

Characterization of extrahepatic viral reservoirs that exert an inhibitory pressure on peripheral dendritic cell function is a key requirement to the investigation of what underlies inadequate host HCV-reactive T lymphocyte responses and failure to resolve HCV infection in humans. Here we quantitatively and qualitatively analyzed dendritic cell function through quantification of intracellular HCV RNA levels in conjunction with multiparameter flow cytometric analysis of cytokine expression in a cohort of long-term viremic untreated HCV-infected patients. We show in this study that *ex vivo* isolated dendritic cells carried the highest intracellular viral load of all blood subpopulations tested. In these HCV-infected individuals, expression of IL-12 and TNF $\alpha$  decreased in a HCV RNA dose-dependant fashion whereas samples not harboring virus displayed expression levels similar to uninfected donors, suggesting that inhibition of expression is directly linked to the levels of HCV RNA in carrier cells. Taken together, these data indicate that the dendritic subset constitutes a host actively targeted by HCV *in vivo*. The persistent impairment of these "infected" cells may result in defects in dendritic-mediated adaptive immune functions that can affect the immunological outcome of HCV infection.

### Keywords

PBMC, dendritic cells, HCV, TLR, inflammatory cytokines, IL-12

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé en Français et mots clés .....	i
Résumé en Anglais et mots clés .....	ii
Liste des tableaux .....	iv
Liste des figures .....	v
Liste des sigles, abréviations et acronymes .....	vi
Avant-propos .....	viii
Introduction .....	1
Chapitre I - Revue de la littérature .....	4
1. Morphogenèse et structure des virions chez les <i>Flaviviridae</i> .....	5
2. Principaux acteurs immunitaires lors de l'infection du virus de l'hépatite C .....	8
2.1 Déterminants immunologiques liés à l'éradication de la virémie circulante ...	9
2.1.1 Réponse humorale et protection que confèrent les cellules B .....	9
2.1.2 Mémoire CD8 <sup>+</sup> requise pour une protection efficace contre une infection VHC persistante .....	11
2.1.3 Persistance de la virémie et évasion en absence d'une mémoire CD4 <sup>+</sup> auxiliaires .....	13
2.2 Étude de la fonction immunogénique des cellules dendritiques comme cause potentielle de ce défaut cellulaire .....	15
2.2.1 Les cellules dendritiques .....	15
2.2.2 Acteurs et cibles de l'hépatite C .....	17
3. Réservoir: évidence d'une réplication virale dans les cellules dendritiques périphériques .....	19
3.1 Tropisme cellulaire: récepteur CD209 .....	21
3.2 Détection du génome viral .....	23
4. Objet du mémoire .....	24
Chapitre II – Article scientifique .....	27
Page titre .....	28
Résumé .....	29
Introduction .....	30
Matériel et méthodes .....	32
Résultats .....	36
Discussion .....	43
Liste des références .....	48
Chapitre III – Discussion et conclusion .....	69
1. Discussion .....	70
2. Conclusion .....	85
Bibliographie .....	86

**LISTE DES TABLEAUX**

Supplemental Table 1. Clinical and Demographic Characteristics of the Untreated HCV-infected Patients .....	56
Supplemental Table 2. Oligonucleotides Used for Real Time RT-PCR Quantifications .....	56



**LISTE DES FIGURES**

Figure 1. Characterization of Specific HCV Reservoirs in PBMCs .....	57
Figure 2. Quantification of Viral RNA Content in Circulating Immune Blood Cell Subpopulations .....	59
Figure 3. Effect of Viral RNA Content on Cytokine Production in Myeloid Dendritic Cells .....	61
Figure 4. Drop in Cytokine Expression is Associated with Viral Carrier Status of PBMCs .....	63
Figure 5. Influence of HCV on Peripheral Blood Dendritic Cell Frequencies .....	65
Supplemental Figure S1. Accurate Strand-specific Quantification of HCV RNA with real-time PCR .....	67
Figure 7. Voies de signalisation des TLR3 et 4 .....	76
Figure 8. Modèle conduisant à la perte de l'activation de l'immunité VHC-spécifique par l'inhibition de la réception des signaux de danger via les TLR dans les dendritiques du sang infectées avec le VHC .....	83

## LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

ARN	Acide ribonucléique
ASGP-R	Récepteur aux asialoglycoprotéines
ASN	Asparagine
BDCA2	Blood dendritic cell antigen 2
CCL	Ligand d'un récepteur de chémokine Chemokine receptor ligand
CCR, CX <sub>3</sub> CR	Récepteur de chémokine Chemokine receptor
CD	Antigène de différenciation <i>Cluster of differentiation</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CTL	Lymphocyte T cytotoxique <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DEN	Virus de la Dengue
DNA	Acide déoxyribonucléique Deoxyribonucleic acid
EBV	virus d'Epstein-Barr
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
HLA	système CMH chez les humains <i>human leukocyte antigen</i>
hVAP	<i>Human vesicle-associated membrane protein-associated protein</i>
HVR1	Hyper variable region 1
IFN-	Interféron
IL-	Interleukine
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
m.o.i.	Multiplicité d'infection <i>Multiplicity of infection</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MIIC	<i>Multivesicular major histocompatibility complex class II peptide-loading compartment</i>
MyD	<i>Myeloid differentiation factor</i>
NF-	<i>Nuclear factor</i>
NK	<i>Natural Killer cells</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PSGL-	<i>P-selectin glycoprotein ligand</i>

RE	Réticulum endoplasmique
RT-	<i>Reverse transcriptase</i>
SR.B1	<i>Scavenger receptor B1</i>
SRAS	Syndrome respiratoire aiguë sévère
T <sub>CM</sub>	Lymphocyte T mémoire centrale
TcR	récepteur de la cellule T <i>T cell receptor</i>
T <sub>E</sub>	Lymphocyte T effecteur différencié
T <sub>EM</sub>	Lymphocyte T mémoire effecteur
T <sub>H</sub>	type de cellule T auxiliaire <i>T helper cell</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF-	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VDBV	Virus de la diarrhée bovine virale
VHC	Virus de l'hépatite C
VHS	Virus de l'herpès
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

## AVANT-PROPOS

Mes trois dernières années passées au sein du laboratoire du professeur Rafick-Pierre Sékaly m'ont mis en contact avec des chercheurs externes travaillant sur l'hépatite C. Les collaborations développées avec ces chercheurs ont visé à démontrer que les lymphocytes B constituaient un réservoir extrahépatique qui produit des particules virales infectieuses (sujet de ma collaboration avec l'équipe de Nahum Sonenberg, Université McGill) et que des ARN d'interférence (siRNA) dirigés contre le génome du VHC pouvaient inhiber la réplication virale dans des lignées de réplicons (sujet de ma collaboration avec l'équipe de Christopher Richardson, Université de Toronto). Ces travaux ont mené à des résultats qui dépassent le cadre du présent mémoire. Ma participation à ces recherches a donné lieu à des contributions à titre de co-auteur dans les publications suivantes:

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

López-Lastra M, Brueschke M, Rodrigue-Gervais IG, Finzi A, Mauro CM, Bruneau J, Bernard N, Murphy D, Svitkin Y, Sékaly RP, Pause A, Cohen E, Sonenberg N. 2004. Hepatitis C virus in peripheral blood lymphocytes from chronically infected donors. Manuscrit en préparation.

## **INTRODUCTION**

L'infection qui est attribuable à l'agent étiologique de l'hépatite C, virus à ARN de polarité positive appartenant à la famille des *Flaviviridae*, évolue dans plus de 80% des cas vers une virémie persistante qui mène à des complications hépatiques. L'infection au VHC est un problème de santé publique d'une importance grandissante, affectant à ce jour 3% de la population mondiale et plus de 10% des populations locales de certains pays du bassin de la Méditerranée. Bien que l'infection au VHC soit l'une des maladies infectieuses chroniques les plus répandues, sa pathogénèse ainsi que les mécanismes responsable de la persistance virale restent encore mal compris.

L'infection par le VHC est caractérisée par une interaction entre le virus et la réponse immunitaire de l'hôte infecté. Cette réponse joue un rôle majeur au cours de la phase aiguë pour assurer l'éradication de la virémie et la guérison spontanée dans 20% des cas. Cette résolution est obtenue grâce à une réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> VHC-spécifique, à condition qu'elle soit de diversité épitopique suffisante et associée à un profil sécrétoire de type T<sub>H</sub>1. En effet, un déficit fonctionnel de cette réponse semble expliquer la persistance virale. Dans ce cas, le développement de l'hépatite chronique intervient malgré la présence d'une réponse lymphocytaire T cytotoxique CD8<sup>+</sup> spécifique du VHC forte et compartimentalisée au niveau hépatique. Or, une dysfonctionnalité du rôle immunogénique des cellules dendritiques dans le cadre de l'infection au VHC a été proposée pour expliquer la perte des réponses T CD4<sup>+</sup> VHC-spécifique chez les sujets progressant vers la forme chronique de l'infection. Des antigènes viraux ont été détectés par immunofluorescence et cytométrie dans les monocytes. Les monocytes sont des précurseurs inflammatoires directs des cellules dendritiques myéloïdes *in vivo* qui capturent les antigènes viraux pour les présenter aux cellules T dans les organes lymphoïdes. Toutefois, les études publiées afin de mettre en lumière des preuves de l'existence d'un réservoir dans des dendritiques et sa contribution à un défaut de présentation aux lymphocytes T n'ont donné lieu qu'à des résultats très controversés.

Aux yeux d'un grand nombre, il est probable que le réservoir dans les dendritiques pour le VHC ne représente seulement que des sites d'accumulation de particules virales par phagocytose au lieu de véritables sites activement ciblés. Aussi, la caractérisation des réservoirs d'origine immunitaire s'avère toujours nécessaire aujourd'hui pour une compréhension de cette pathogénèse puisqu'une telle approche devrait donner des indices concernant les mécanismes qui sous-tendent l'évolution des réponses inadéquates au niveau des lymphocytes T VHC-spécifiques qui sont associées avec l'incapacité de l'hôte à éradiquer l'infection. En ce sens, l'objectif de la recherche présentée dans ce mémoire, rédigé par article, a été d'identifier la présence d'un réservoir VHC extrahépatique chez les dendritiques en circulation dans le sang.

L'approche expérimentale a consisté à développer des outils quantitatifs (i.e. PCR en temps réel, cytométrie intracellulaire) qui ont permis de déterminer qu'il y avait constitution d'un réservoir important au plan immunologique au sein des cellules dendritiques périphériques isolées par cytométrie en flux, et ce à partir d'échantillons sanguins prélevés chez des patients chroniquement infectés.

La première partie de ce mémoire consiste en une revue de la littérature décrivant les principaux acteurs immunitaires lors de l'infection au virus de l'hépatite C ainsi que les mécanismes d'interférence supposés agir sur les fonctions des cellules dendritiques. Le chapitre suivant reproduit l'article scientifique faisant état des résultats obtenus au cours de cette recherche. En dernier lieu, le chapitre III présente les éléments de discussion qui permettent de répondre de manière adéquate à la problématique retenue dans le cadre de cette recherche. Ces travaux contribuent à notre compréhension des mécanismes par lesquels l'hôte peut se défendre contre le VHC.

**CHAPITRE I**  
**REVUE DE LA LITTÉRATURE**



## 1. MORPHOGENÈSE ET STRUCTURE DES VIRIONS CHEZ LES *FLAVIVIRIDAE*

L'objectif de cette section est de décrire brièvement la famille taxonomique à laquelle appartient le VHC afin de montrer qu'il existe d'étroites similarités entre les cycles de réplication des virus de cette famille, notamment dans l'assemblage des particules virales au sein du réticulum endoplasmique (RE). La famille des *Flaviviridae* regroupe des virus enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive, long de 9.5 à 12.3 kb, ne codant que pour un seul cadre de lecture ouvert flanqué par deux régions non codantes (UTR) en 5' et 3'. Trois genres constituent cette famille. Le genre des flavivirus qui comprend, entre autre, le virus de la fièvre de dengue (DEN), celui des pestivirus qui inclut le virus de la diarrhée bovine (VDBV), un virus souvent utilisé comme modèle d'étude du VHC et, enfin, le genre des hépacivirus qui comprend notamment les six génotypes et plus de 70 sous-types du VHC (36). Le VHC partage une homologie séquentielle et structurelle avec le flavivirus DEN et les pestivirus (245).

Le génome de la souche New Guinea-C DEN2 fait 10.7 kb et, contrairement au VHC et pestivirus, contient une coiffe de type 1 pour l'initiation de la traduction à l'extrémité 5' mais sans poly(A) en 3' (41,147). La région 5'UTR du VHC comporte 341 nucléotides couvrant quatre domaines riches en structures tiges-boucles (dénotés I à IV), les domaines II, III, IV formant le site interne d'entrée du ribosome (IRES) (224,361), structure qui fixe la sous-unité 40S du ribosome et permet ainsi l'initiation de la traduction du cadre de lecture unique de 3420-30 acides aminés selon le génotype considéré (23,226,229,230). La région 3'UTR comporte une région poly(U/C) suivie d'une région conservée de 98 nucléotides repliée en trois tiges-boucles successives, connue sous le nom de région X (246), qui, au cours de la réplication, est nécessaire à l'initiation de la synthèse transcriptionnelle du brin d'ARN anti-sens par l'ARN polymérase ARN-dépendante. Cette dernière synthétise un brin d'ARN de polarité négative à partir du génome qui sert par la suite de matrice pour la transcription de nombreux brins d'ARN génomiques qui seront soit

encapsidés et enveloppés pour devenir les génomes des particules virales néoformées, soit serviront de messagers pour la traduction de nouvelles protéines virales (25,219).

La région codant les protéines de structure est située en 5' et précède les séquences codantes pour les protéines non-structurales (NS) qui assurent les fonctions enzymatiques essentielles à la réplication du génome viral. La polyprotéine résultante est clivée par des signalases cellulaires (68,311) et par les protéases du virus (66,110) en dix protéines virales dans l'ordre qui suit: NH<sub>2</sub> Core-E1-E2p7-NS2NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B COOH (290). Core est considérée comme la protéine formant la nucléocapside et E1 (gp31) et E2 (gp70) sont les glycoprotéines transmembranaires de type I pH-dépendante constituant l'enveloppe virale. La gp31 porterait le peptide d'ancrage requis à la fusion de l'enveloppe virale avec l'endosome après endocytose (88), alors que la gp70 est impliquée au niveau de la reconnaissance extracellulaire du récepteur et l'attachement des particules (277). Un changement -2/+1 dans le cadre de lecture au 11<sup>e</sup> codon de la Core mène à la synthèse de la protéine F (pour *frameshift*) de 17 kDa dont la demie vie est < 10 minutes *in vitro* (381,382) et pour laquelle aucune fonction essentielle n'a été présentement identifiée. Toutefois, la présence d'anticorps anti-F (177) ainsi qu'une réponse dirigée contre des épitopes 9-mer (16) suggèrent un rôle probable de cette protéine dans le cycle viral.

Les protéines non-structurales sont clivées par les deux protéases virales, d'une part la protéase NS2-NS3 dotée d'une activité autocatalytique en *cis* permettant le clivage NS2-NS3 (109) et d'autre part, la sérine protéase NS3 qui, associée à son co-facteur NS4A, assure le clivage de l'ensemble des jonctions situées en aval. L'ARN polymérase NS5B (protéine de 68 kDa) ainsi que les autres protéines non-structurales s'associent à des protéines cellulaires de l'hôte comme hVAP-33 (95) pour former un complexe de réplication (150,323) qui, en continuité avec la membrane du RE, réside dans des structures membranaires péri-nucléaires parfois circonvolutées (7,74,75,106). Ces modifications ultrastructurales où siège la réplication virale pourraient être également le site du clivage de la polyprotéine et de l'assemblage des virions.

L'étude de la morphogenèse du VHC est retardée par le fait qu'il n'existe toujours aucun système cellulaire *ex vivo* capable de propager efficacement le virus en culture. Toutefois, l'infection d'hépatocytes de chimpanzés et l'accès à des biopsies de foies humains infectés a permis d'observer, par microscopie électronique et immunomarquage, la présence d'une particule sphérique à symétrie icosaédrique de 55-70 nm de diamètre, contenant une nucléocapside interne de 30 nm entourée d'une membrane lipidique dérivée du RE qui, contrairement aux flavivirus (185,252), présenterait à sa surface des projections épineuses (61,149,211,324,337). À l'exception de l'assemblage des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, aucune donnée n'est disponible sur l'assemblage de la particule virale et le relargage des virions de la cellule infectée. Cependant, la formation des complexes de glycoprotéines d'enveloppe ayant lieu dans le RE comme pour les flavivirus, il est probable que le VHC suive le même schéma qu'eux et bourgeonne dans le RE pour suivre ensuite la voie sécrétoire via l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique (233).

Ces connaissances sont exposées en détail dans plusieurs revues récentes (67,262). Il a ainsi été montré que les protéines E1 et E2 étaient dirigées, au cours de leur synthèse, vers la lumière du RE. En effet, l'extrémité C-terminale hydrophobe de la capsid sert de séquence signal au précurseur E1-E2-p7-NS2 et déclenche sa translocation dans le RE. Ce précurseur est libéré de son peptide signal, et la capsid est libérée de son extrémité C-terminale ancrée dans la membrane du RE (240), par des signal peptidases du RE. Une fois clivées, les protéines E1 et E2 s'assemblent en hétérodimères et leurs domaines TM jouent un rôle important dans cette interaction. Les protéines E1 et E2 sont modifiées par des N-glycosylations au cours de leur formation dans le RE. Elles possèdent 6 et 11 sites potentiels respectivement. Cinq des six sites potentiels sont utilisés sur la protéine E1 selon le génotype. Cependant, exprimée seule, E1 n'est qu'incorrectement glycosylée, ce qui suggère la présence d'une séquence peptidique en aval nécessaire à sa glycosylation. L'état de glycosylation effectif de la protéine E2 n'a pas été élucidé, mais les analyses de déglycosylation ont montré que la plupart des sites (11 dénombrés dont 9 très

conservés) sont certainement utilisés (104) et l'état de la glycosylation peut jouer un rôle dans la reconnaissance des récepteurs cellulaires, qui restent mal identifiés, tel que l'illustre si bien le cas de DEN où l'utilisation différentielle du site de N-glycosylation Asn153/154 commun à tous les flavivirus explique le tropisme cellulaire de ses quatre sérotypes. Aussi, tandis que les enveloppes E des sérotypes 1 et 3 de DEN sont glycosylées en Asn 67 et 153, celles des types 2 et 4 ne sont glycosylées qu'à l'Asn 67. À m.o.i. égales, Navarro-Sanchez *et al.* (257) observent une diminution drastique du pouvoir infectieux de DEN de types 2 et 4 sur des cellules dendritiques CD209<sup>+</sup> (DC-SIGN). Il semble donc que la glycosylation en Asn 153 soit importante pour une haute affinité avec le récepteur CD209 et l'infection de ce type cellulaire. Nous discuterons plus amplement la signification de ces résultats pour le tropisme du VHC à l'égard des dendritiques dans la section 3.1.

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

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

L'infection au VHC est un problème de santé publique d'une importance grandissante, affectant à ce jour 3% de la population mondiale et plus de 10% des populations locales de certains pays du bassin de la méditerranée (10). L'infection se caractérise dans la grande majorité des cas par une forme persistante qui mène progressivement chez environ 20% des porteurs virémiques à l'émergence de complications tels la fibrose et un échec hépatique inflammatoire du foie (62,141). Étant donné que l'infection aiguë au virus de l'hépatite C est médicalement non apparente dans la plupart des cas cliniques, les corrélats immunologiques susceptibles de déterminer le rétablissement n'ont été que très peu définis par la littérature récente. De fait, la comparaison détaillée des réponses humorales et cellulaires a été entravée par le fait que les cohortes de patients humains VHC-séropositifs sont habituellement

hétérogènes et que les données cliniques concernant un suivi à long terme des paramètres immunitaires dès la phase aiguë de l'infection ne sont que rarement disponibles en raison de son diagnostic difficile (265). Néanmoins, l'on pense que la réponse immunitaire acquise à médiation cellulaire, qui fait appel entre autre aux lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (CTL), contribue à l'élimination des cellules infectées et mène au contrôle de la virémie lors d'hépatite C aiguë (175,190,248,268).

La persistance de l'hépatite C peut dépendre de nombreux facteurs, soit d'ordre viral (i.e. une virémie élevée, une hétérogénéité génétique de la population virale, l'apparition de mutants d'échappement, l'existence de réservoirs extrahépatiques), soit d'ordre génétique tels le récepteur KIR2DL3 sur les NK (174) et les allèles HLA-C des groupe 1 et 2 qui influencent directement la capacité de l'hôte à résoudre l'infection (81,351). En outre, il existe une convergence d'arguments en faveur d'un rôle qualitatif des réponses immunitaires et il est vraisemblable que différents mécanismes s'intriquent pour aboutir à l'échec de l'immunité anti-VHC (76,108,148,281,327,357,376). Dans la présente section, nous illustrerons en quoi le système immunitaire détient un rôle fondamental dans l'histoire naturelle de la pathogénèse virale liée au VHC et comment la persistance semble en fait due à l'impuissance de la réponse antivirale de l'hôte à endiguer la progression de la viémie et à éradiquer les réservoirs de cellules infectées.

## **2.1 Déterminants immunologiques liés à l'éradication de la virémie circulante**

### **2.1.1 Réponse humorale et protection que confèrent les cellules B**

Durant la phase aiguë de cette infection, une immunité humorale vis-à-vis du VHC est détectée par les tests immunoenzymatiques, mettant en évidence une production d'anticorps spécifiques dirigés à la fois contre les épitopes des protéines structurales et non structurales du virus (11,168). De nombreux arguments plaident en faveur d'un effet neutralisant de certains anticorps au cours de l'infection virale. Des expériences de neutralisation ont été tentées chez le chimpanzé *Pan troglodytes* (seul modèle animal existant) avec des sérums hyperimmuns de lapin obtenus par immunisation contre un peptide synthétique dérivé de la région hypervariable 1 (HVR1) de la

protéine E2 à la recherche d'une capacité protectrice (83,84,178,179). Les anticorps de patients atteints d'hépatite C aiguë ou chronique contiennent des anticorps capables d'inhiber la fixation des protéines d'enveloppe E2 du virus à des lignées cellulaires *in vitro* (172), en particulier des lignées d'origine hépatocytaire. D'autres cibles des réponses anticorps existent sur le génome viral, mais le rôle de ces réponses dans la protection contre l'infection est mal connu et leur valeur protectrice reste discutable (146).

La production d'anticorps neutralisants permet à l'hôte infecté de contrôler et d'éliminer de nombreuses infections virales. Cependant, à ce jour aucune différence qualitative ou quantitative des réponses humorales n'a été impliquée dans la guérison ou la persistance du VHC après un épisode aigu (188,279,340). Après la guérison, la réponse humorale dirigée contre les protéines d'enveloppe peut disparaître alors qu'en revanche la réponse lymphocytaire T dirigée contre les protéines non-structurales demeure détectable chez l'être humain neuf fois sur dix (346). Cette réponse est fonctionnelle puisqu'elle permet de prévenir la ré-infection expérimentale chez le primate (22). En effet, les travaux de P. Farci et ses collègues (82) démontrèrent, chez des chimpanzés convalescents, l'inefficacité de la réponse humorale à protéger contre une recrudescence de la virémie suite à une ré-infection avec des isolats VHC homologues (235,296). À l'opposé, ces anticorps anti-VHC seraient impliqués dans les manifestations extrahépatiques de l'hépatite C chronique. Ainsi, celle-ci est fréquemment associée à une cryoglobulinémie de type II ou III (2,189,315). En résumé, la réponse humorale spécifique du VHC, bien qu'associée à un certain pouvoir neutralisant, n'est pas suffisante pour protéger contre une ré-infection ou à éviter la dissémination du virus au cours de l'infection aiguë. Elle peut toutefois être abondante et aboutir à la formation de complexes immuns à l'origine des pathologies associées à une cryoglobulinémie de type II ou III.

### **2.1.2 Mémoire CD8<sup>+</sup> requise pour une protection efficace contre une infection VHC persistante**

Une réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> cytotoxique VHC-spécifique restreinte par le CMH-I est présente dans le foie et les cellules mononucléées (PBMC) du sang périphérique des patients atteints d'hépatite C (378). La résolution de l'infection primaire au VHC est temporellement associée avec une réponse CTL diverse et durable qui contribue chez le chimpanzé, et probablement chez l'être humain, à la résolution rapide des ré-infections (241,326,370,371). Il est clairement montré qu'au cours de l'hépatite C aiguë, le nombre de clones lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC produisant de l'IFN- $\gamma$  présents dans le sang périphérique est corrélé avec l'éradication du VHC 6 mois après le début de l'infection (118). Au cours de l'hépatite chronique, les CTL spécifiques du VHC sont également détectables dans l'infiltrat cellulaire hépatique où ils sont pour certains chercheurs plus abondants que dans le sang périphérique (181). Des études quantitatives de la réponse T Ag-spécifique fondées sur des mesures de fluorescence des interactions tétramériques HLA/peptides du VHC réalisées au cours de l'infection chronique ont montré que la réponse CTL spécifique, bien que régulièrement détectée au niveau du foie (129), était souvent plus faible en intensité (19) que la réactivité de mémoire vis-à-vis d'autres virus comme ceux de l'influenza A, du cytomégalovirus ou du virus d'Epstein-Barr (291,293).

Une corrélation inverse entre l'intensité de la réponse cytotoxique et la charge virale a été montrée (292), suggérant que la réplication du VHC est contrôlable par les CTL (78), mais que ce contrôle n'est le plus souvent que partiel dans la majorité des cas infectés (134,260). Il a donc été avancé que la diversité épitopique de la réponse CTL spécifique du VHC est plus large chez les patients ayant une hépatite aiguë virale C guérissant spontanément que chez ceux développant une hépatite chronique (42,52,331). Lechner *et al.* (203) confirment que la réponse CD8<sup>+</sup> est forte chez les personnes qui guérissent alors qu'elle est très faible, voire indétectable, chez des patients chroniquement infectés. L'action des CTL sur l'élimination de la virémie pourrait être le résultat de la lyse des cellules infectées par l'axe granzyme-perforine

(128) et/ou l'action de certaines cytokines, telles que l'IFN- $\gamma$  (92,192,353), capables d'inhiber la réplication intracellulaire des virus hépatotropiques (119).

R. Thimme *et al.* (354) ont publié des résultats qui suggèrent que la réplication du VHC est contrôlée de façon précoce par des CD8<sup>+</sup> agissant par un mécanisme non cytolytique. Ainsi, un sujet étudié au moment très précoce de son infection et qui élimina la virémie, a présenté un épisode d'hépatite aiguë prolongé coïncidant avec l'apparition de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> anti-VHC et une diminution légère de la charge virale. À la suite de l'apparition d'une forte réponse CD4<sup>+</sup>, ces lymphocytes CD8<sup>+</sup> ont perdu le marqueur CD38 et acquis la capacité de produire de l'IFN- $\gamma$  en réponse au VHC. L'émergence de CD8<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> est associée avec une diminution rapide de la virémie circulante (5 log<sub>10</sub>) sans reprise de la maladie hépatique. Pour les autres patients à l'étude, l'infection est devenue chronique chez les sujets qui ne développèrent aucune réponse cellulaire T et chez ceux pour qui la réponse CD4<sup>+</sup>, initialement forte, a disparu.

L'ensemble de ces travaux montre que la rapidité de réplication permet probablement au VHC de devancer la réponse CTL et de persister. Une haute charge virale VHC pourrait mener à l'épuisement des cellules T Ag-spécifiques (94,267). Le début de l'hépatite coïncide avec le début de la réponse CTL. Néanmoins, l'élimination du virus pourrait être médiée par une population de CD8<sup>+</sup> contrôlant la réplication du VHC par des mécanismes cytolytiques et non-cytolytiques (202), mais dont la fonction dépend d'une réponse CD4<sup>+</sup> efficace. Puisque le VHC infecte principalement les hépatocytes, les CD8<sup>+</sup> VHC-spécifiques ne seraient qu'insuffisamment générés en premier lieu, peut-être en raison d'une activation déficiente au niveau des cellules T naïves (27,28,213) ou d'une aide CD4<sup>+</sup> insuffisante une fois les cellules T VHC-spécifiques naïve activées (186). En effet, les travaux de Wedemeyer *et al.* (369) ont permis de constater que les CD8<sup>+</sup> spécifiques du VHC bien que présents chez les cas virémiques, ne proliféraient guère à la suite de la reconnaissance de leurs déterminants antigéniques par le TcR, contrairement à la cohorte avirémique sous étude. Ces auteurs ont corrélés ces anomalies (120,204,364)



avec la diminution de la réponse IFN- $\gamma^+$  *ex vivo* des CD4<sup>+</sup> en Elispot, sans pour autant qu'il s'agisse d'un *switch* classique d'une réponse T<sub>H1</sub> vers T<sub>H2</sub> puisque la sécrétion d'IL-5 n'est pas plus élevée. En conclusion, les preuves d'une immunité CTL spécifique antivirale sont nombreuses tant au niveau périphérique qu'au niveau hépatique. Toutefois, la persistance virale malgré la présence de cette réponse CTL pourrait s'expliquer par un déficit fonctionnel de cette réponse en lien avec une limitation de la reconnaissance antigénique du virus par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> (47,101,155,395).

### **2.1.3 Persistance de la virémie et évasion en absence d'une mémoire CD4 auxiliaires**

Bien que nous venons d'illustrer précédemment que des corrélations temporelles et fonctionnelles existent entre une activité CTL et le contrôle initial de l'infection, la virémie persistante et la présence de CTL VHC-spécifique dans l'infiltrat intrahépatique et en périphérie, tout au long de l'évolution chronique de cette infection (79), tendent à démontrer que les CTL seuls sont incapables d'enrayer la virémie. La réponse CD8<sup>+</sup> qui perdure indéfiniment chez le modèle chimpanzé à l'état chronique s'avère en être une preuve supplémentaire. En effet, le maintien d'une réponse CD8<sup>+</sup> lors d'une infection virale chronique dépend de la présence de CD4<sup>+</sup> spécifiquement dirigés contre des antigènes du virus dans plusieurs modèles d'infection (165,166,238,330,344,391). La déplétion expérimentale, chez le chimpanzé, du répertoire CD4<sup>+</sup> conduit à la persistance de l'infection virale, malgré l'existence d'une mémoire effectrice CD8<sup>+</sup> établie (111). Le défaut de la réponse CD4<sup>+</sup> constitue à lui seul un élément permettant de rendre compte de la chronicité de l'infection (322,343), et ce de façon indépendante de la sélection de mutants d'échappement à la pression immunitaire. Aussi, chez le chimpanzé, la réponse précoce VHC-spécifique CD4<sup>+</sup> intrahépatique est fortement corrélée avec l'éradication virale.

L'étude de Sugimoto *et al.* (342) illustre ces faits cliniques chez l'être humain puisqu'elle établit clairement que, chez les porteurs chroniques, la réponse CD4<sup>+</sup> en

terme de fréquence VHC-spécifique  $\text{IFN-}\gamma^+$ / $10^6$  PBMC est de dix fois inférieure à celle observée chez les cas ayant évolué vers la guérison. De plus, une réponse  $\text{CD4}^+$  de faible envergure (en terme du nombre et de la diversité des épitopes reconnus) a été mise en évidence chez les sujets ayant développé une infection chronique alors qu'elle est forte, multi-spécifique et durable chez ceux qui éliminent le virus (87,100,139,396). Le rôle important des  $\text{CD4}^+$  a, en outre, été validé par l'observation d'une corrélation significative entre l'éradication spontanée de la virémie et l'expression d'allèles spécifiques du CMH-II (HLA-DRB1\*1101 et/ou DQ1\*0301) (9,48,126,187,236,247,355). D'autres études ont confirmé qu'une restriction de la réactivité des lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  spécifiques du VHC s'associait plus volontiers avec l'état virémique (31,63,64,299,319). Ainsi il a été observé qu'il y avait recrudescence de la virémie malgré un contrôle transitoire chez les cas cliniques montrant, dès la phase aiguë, une perte de la réponse proliférative VHC-spécifique  $\text{CD4}^+$  (100,354).

L'élimination de la virémie paraît donc d'autant plus probable que se développe une réponse  $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$  précoce et durable, avec comme suite l'activation optimale des CTL contre de multiples motifs antigéniques conservés au sein du virus (49,57,102,318). Conséquemment, lors de la phase aiguë, la progression vers la forme chronique pourrait être expliquée, du moins en partie, par une réponse  $\text{CD4}^+$  spécifique insuffisante (73), notamment en terme de diversité des épitopes antigéniques reconnus sur la polyprotéine du VHC (103), et associée à une sécrétion réduite de cytokines de type 1 nécessaires au développement de la voie à médiation cellulaire.

Chez des individus évoluant vers la chronicité, Ulsenheimer *et al.* (363) rapportent la détection, dès les premières semaines de l'infection, de cellules  $\text{CD4}^+$  VHC-spécifiques présentant une fonction altérée qui se manifeste par une diminution abrupte de la réponse proliférative  $\text{CD4}^+$  VHC-spécifique suivie d'un déclin rapide de la sécrétion d' $\text{IFN-}\gamma$ . Ceci correspond pour ces auteurs à l'épuisement par anergie de l'immunoréactivité  $\text{CD4}^+$  spécifique (300). Il n'est pas impensable que cet état acquis

*in vivo* soit en partie directement lié à la qualité des signaux activateurs transmis par les cellules dendritiques. À raison puisqu'elles sont les seules cellules attirées à la présentation antigénique en mesure d'activer une réponse primaire à partir des cellules T naïves (151,152,157) et de conduire à l'établissement d'une mémoire immunologique compétente (112,194,195,196,339). Par conséquent, l'incapacité de l'hôte à monter une réponse immunoréactive CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 efficace contre les antigènes du VHC en raison d'une interférence virale avec les fonctions des cellules immunitaires spécialisées dans la présentation d'antigènes, c'est-à-dire les dendritiques, pourrait expliquer l'incapacité des sujets séropositifs à supprimer leur infection virale. Ainsi, il est approprié de se demander s'il y a une dysfonctionnalité du rôle immunogénique des dendritiques dans le cadre de l'infection VHC qui compromettrait la qualité des cellules T qui répondent contre les antigènes viraux.

## **2.2 Étude de la fonction immunogénique des cellules dendritiques comme cause potentielle de ce défaut cellulaire**

### **2.2.1 Les cellules dendritiques**

Les dendritiques sont des leucocytes rares (0.2-0.5% dans le sang) originaires de la moëlle osseuse qui représentent une population hétérogène en périphérie et dont la fonction première est d'assurer la présentation d'antigènes aux lymphocytes T à titre d'initiateur de la réponse immunitaire spécifique. Elles sont des acteurs primordiaux du système immunitaire de par leur situation à l'interface entre l'immunité innée et acquise. Il existe différentes sous-populations, présentes en faible quantité dans tous les tissus et caractérisées par des fonctions et des capacités migratoires distinctes. Ce sont les dendritiques de Langerhans qui furent les premières décrites en 1868, mais ce n'est seulement qu'à partir de 1973, que Steinman et Cohn caractérisèrent une population leukocytaire bien particulière (338). Selon ces derniers auteurs, ces cellules étaient capables de capturer des particules antigéniques nominales, pour venir ensuite dans les ganglions lymphatiques en présenter les peptides constitutifs aux lymphocytes T dans le contexte d'une restriction CMH afin d'initier l'activation de la réponse acquise (121,242,280,352).

Il existe divers sous-populations de dendritiques chez l'être humain, caractérisées par des fonctions distinctes (216,325). Ainsi distingue-t-on schématiquement deux grands types de dendritiques: les plasmacytoïdes et les myeloïdes (59). Les plasmacytoïdes furent identifiées initialement dans les zones T des ganglions lymphatiques (142,206) et ont été initialement interprétées par certains comme étant des lymphocytes T plasmacytoïdes (26, 116). Leurs précurseurs circulent en périphérie sous forme d'un contingent cellulaire  $CMH-II^+CD4^{hi}CD11c^-CD123^+BDCA2^+$  (lectine C de type II, 70) et  $CD62L^+$  (sélectine-L) (71,72) qui est spécialisé dans la sécrétion rapide d'IFN de type I après stimulation via les TLR7 et TLR9 par un virus (46,136,217,329). Pour leur part, les dendritiques myeloïdes circulant dans le sang représentent un contingent  $CMH-II^+CD4^+CD11c^+CD123^{lo}BDCA2^-$  qui n'exprime aucun des marqueurs caractéristiques des autres lignées de leucocytes mononucléés (TcR $\alpha\beta$ CD3 lymphocytes T, CD14 monocytes, CD19 lymphocytes B, CD56 lymphocytes NK) et qui, contrairement aux plasmacytoïdes, déploie un éventail bien plus large de TLR (1 à 8) pour alerter l'hôte quant à la présence d'agents pathogènes (215). Les monocytes  $CD14^+$  sanguins, précurseurs des macrophages tissulaires, peuvent dans certaines conditions inflammatoires servir de précurseurs directs des dendritiques myeloïdes (286,287,288,320). Ces monocytes  $CCR2^+CX_3CR^{lo}$ , dont le profil d'expression des molécules d'adhésion leur permet d'être facilement recrutés dans les sites inflammatoires ( $PSGL-1^+CD62L^+$ ), constituent une réserve de dendritiques rapidement mobilisables qui participent à la capture et à la présentation des antigènes (99).

Les fonctions des dendritiques sont tout à fait distinctes selon leur stade de maturation (17,18,40). Cela est bien reflété par leur aspect morphologique radicalement différent et l'expression à leur surface de molécules distinctes. Les myeloïdes sont surtout représentées dans les tissus d'interface avec le monde extérieur. Dans ces positions de sentinelles, les myeloïdes sont dites immatures. Elles présentent un phénotype de surface ( $CD83^-CD86^+CD40^{dim}CCR7^-$ ) reflétant leur spécialisation en phagocyte capturant les antigènes, où ces derniers, une fois internalisés, sont dirigés vers les compartiments endosomaux MIIC (44,362) ou la

voie de *cross-présentation* sur le CMH-I (1,122,143,180). Aussi ont-elles des récepteurs de chémokines tels CCR5 et CCR6 (333,334,366) leur permettant de répondre aux stimuli inflammatoires afin de gagner les foyers où des dangers ont été repérés (273). Après avoir été exposées aux stimuli inflammatoires (i.e. cytokines inflammatoires ou *pathogen-associated molecular patterns* PAMPs), les myéloïdes subissent un processus de maturation se traduisant par une modification profonde de leur phénotype (39,305). Elles vont non seulement s'équiper (CD83<sup>+</sup>CD86<sup>hi</sup> CD40<sup>+</sup> et synthèse de cytokines tels l'IL-2 (86,113,114,115), IL-12 (231,332), IL-23 (263) et l'IL-27 (274)) pour interagir efficacement avec les lymphocytes T, mais vont, en plus, changer de phénotype migratoire (CCR7<sup>+</sup> (65)). Ce faisant, elles peuvent quitter les tissus et gagner les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront rencontrer les lymphocytes T et leur présenter les peptides apprêtés sur leurs molécules du CMH (56,304). En contrepartie, puisqu'elles sont si efficaces en tant que sentinelles qui orchestrent l'induction des réponses acquises au niveau des tissus lymphatiques, les dendritiques, à leur insu, sont susceptibles d'être activement ciblées par les pathogènes désirant persister chez l'hôte.

### **2.2.2 Acteurs et cibles de l'hépatite C**

De façon générale, la littérature considère que les virus ne se comportent pas en tant qu'antigènes inertes une fois reconnus par les dendritiques, lesquelles sont parmi les principales cibles des effets délétères qu'ont développés ces agents infectieux pour contrecarrer les systèmes de défense innée (244). D'ailleurs, notons l'exemple des *herpesviridae* qui infectent très efficacement les dendritiques bien que le cycle viral y soit très peu productif, s'avérant même abortif (160,294). Au lieu d'employer ces cellules comme réservoir de production, les herpèvirus interfèrent activement avec leur capacité à induire une réponse immunitaire protectrice (5,130,183,285) et, dans certains cas, ils vont même à les utiliser comme vecteur de relais pour faciliter leur dissémination en *trans* à travers les tissus permissifs de l'hôte (124). L'étude de ces acteurs dans le contexte de l'infection au VHC recèle certainement des informations clés qui permettraient d'expliquer la perte des corrélats de protection décrits plus haut.

Depuis les constats posés par l'étude de Hiasa *et al* (131), les dendritiques ont pris de l'importance en tant qu'acteur et cible probable du VHC. Ces travaux préliminaires indiquent l'existence d'une inefficacité allostimulatrice associée à une réduction du niveau d'expression du messenger ARN codant pour la chaîne  $\beta$  (p40) de l'IL-12 dans des dendritiques d'origine murine exprimant les protéines structurales Core-E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub> (132). L'IL-12 est un hétérodimère formé par l'association covalente des chaînes légères  $\alpha$  (p35, et lourdes  $\beta$  (p40) nécessaire à la différenciation des CD4<sup>+</sup> en cellules T<sub>H</sub>1 (232,358). Les travaux de l'équipe de Hori (169) ainsi que ceux de Levy (14) et Inchauspé (15) ont montré que la capacité allostimulatrice des dendritiques dérivées à partir des monocytes CD14<sup>+</sup> originant de sujets virémiques non-traités était inhibée contrairement à celle de donneurs avirémiques traités aux IFN- $\alpha$  ou sains. Une réduction des fonctions stimulatrices des contigents CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CMH-II<sup>+</sup> *ex vivo* est d'ailleurs rapportée chez les cas chroniques sans régime antiviral qui présentent des dendritiques circulantes synthétisant, lors de l'activation par les TLR, des quantités insuffisantes de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et l'IFN- $\alpha$  (6,170,254). Donc, la présence de dendritiques dysfonctionnelles pourrait être directement impliquée dans le déclin des CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> VHC-spécifique *in vivo*.

Des preuves empiriques d'une évolution distincte des CD8<sup>+</sup> VHC-spécifique proviennent d'études détaillées du phénotype (227). Ces études ont noté dans une comparaison parallèle avec les CD8<sup>+</sup> spécifiques pour EBV, le VIH ou CMV, l'accumulation de cellules peu différenciées après reconnaissance des antigènes du VHC (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), tandis que CMV était à l'extrême avec son profil de mémoire effecteur CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> complètement différencié contenant des niveaux bien plus élevés de perforines dans les granules cytotoxiques que leur homologue VHC-spécifique (13). Ces observations suggèrent que les CD8<sup>+</sup> spécifiques pour le VHC seraient incapables *in situ* de compléter leur différenciation en mémoires effecteurs car arrêtés au stade de mémoire centrale CCR7<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> (256). Ces irrégularités développementales peuvent être secondaires à l'activité aberrante des dendritiques observée chez des patients séropositifs. De fait, divers auteurs ont

souligné le rôle indispensable de l'IL-12 dans l'expansion clonale et l'activation fonctionnelle optimale des lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> naïfs (8,53,54,55,314,316,365). Cleary *et al.* (45) sont les premiers à avoir montré chez l'être humain que la signalisation via la chaîne  $\beta$ 1 de l'IL-12R est nécessaire pour l'accumulation *in vivo* d'une mémoire effecteur CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 capable de sécréter de l'IFN- $\gamma$ . Les travaux de Mullen (253) ont démontré qu'une signalisation médiée par l'IL-12 est requise afin de sélectionner l'expansion et la survie d'une population T<sub>H</sub>1 nouvellement formée *in vivo*. Dès lors, l'inhibition de l'expression de l'IL-12 rapportée pour l'hépatite C serait délétère au maintien d'un réservoir de mémoire IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> VHC-spécifique suffisamment grand dans le temps pour qu'il puisse assurer une protection contre l'infection.

Les résultats publiés par Sarobe *et al.* (309) prouvent que l'inhibition de l'expression du gène IL-12p40 dans les dendritiques humaines exprimant la Core et l'enveloppe E1 corrèle avec une activation déficiente des cellules CD4<sup>+</sup>. Ceci montre que les anomalies fonctionnelles rapportées pour les dendritiques dans le cadre de l'infection VHC peuvent être reproduites par l'expression ectopique de la capsid du virus (197,310). Conséquemment, expliquer l'apparition de la chronicité chez les sujets infectés avec le VHC par l'intermédiaire d'une infection au sein des dendritiques représente un modèle intéressant qui pourrait être à la base d'une compréhension de la perte fonctionnelle des effecteurs VHC-spécifique T<sub>H</sub>1 et des réponses CTL qui en découlent. Aucune de ces possibilités peut, cependant, s'appliquer s'il n'y a pas de dendritiques infectées *in vivo* chez l'hôte séropositif.

### **3. RÉSERVOIR: ÉVIDENCE D'UNE RÉPLICATION VIRALE DANS LES CELLULES DENDRITIQUES PÉRIPHÉRIQUES**

L'appartenance du VHC à la famille des *flaviviridae* a d'emblée fait évoquer la possibilité d'une infection des cellules du système immunitaire. La notion de réservoirs extrahépatiques d'origine hématopoïétique du VHC a émergé en 1992 et est progressivement devenue une référence obligée pour expliquer certaines propriétés de l'infection chronique par ce virus. Plus précisément, l'existence de réservoirs au sein

des dendritiques expliquerait l'échec du système immunitaire à contrôler la virémie et serait un des principaux obstacles à l'éradication de l'infection virale. Ce qui n'était qu'une hypothèse scientifique, étayée par des données pertinentes mais préliminaires, est devenu un paradigme susceptible d'orienter les futures stratégies thérapeutiques vis-à-vis du VHC. Pourtant, à l'analyse, les données qui sous-tendaient initialement le concept de réservoir perturbant la fonction immunogénique des dendritiques sont fragiles et aucune investigation complémentaire n'est venue apporter la confirmation définitive de ce concept. Au contraire, certains résultats récents le remettent en question (191,199,218,220,239) et, de plus, il s'installe une certaine confusion puisque des auteurs différents utilisent le même vocable, celui de réservoir, pour décrire des phénomènes distincts. Pour ces auteurs, les dendritiques ne constituent pas l'une des principales cibles des effets délétères du virus, que ces effets soient directement viro-induits après une interaction avec des récepteurs cellulaires ou provoqués par la création d'un réservoir au sein de cette population. Sur la base de leur données expérimentales, ces cellules ne peuvent bénéficier du qualificatif de réservoir puisqu'il n'y a pas d'arguments pour affirmer qu'il existe, dans ces sites, une population virale autonome, distincte de celle présente dans la circulation générale, d'autant que les fonctions de présentation d'antigène des dendritiques de sujets VHC-infectés ne sont pas compromises. Les défauts observés par d'autres études ne seraient plutôt qu'une conséquence passive de pathologies secondaires émanant d'une virémie plasmatique élevée lors de la persistance.

En ce sens, le réservoir doit être distingué du site de production primaire dans lequel le virus se multiplie activement sans provoquer de signes majeurs au début d'une infection aiguë et, *a fortiori*, des organes cibles dans lesquels il se multiplie activement ensuite pour donner les signes cliniques et/ou biologiques de la maladie. Un exemple en est fourni par le virus de l'herpès simplex (VHS) qui persiste à l'état latent dans les neurones d'un ganglion nerveux sensitif et qui peut épisodiquement se réactiver pour donner une récurrence clinique à localisation cutanéomuqueuse (24,159). Dans les neurones sensitifs, le VHS latent persiste sous la forme de son



génomique isolé (ADN épisomal) avec, pour seule activité décelable, la production de quelques transcrits de latence.

Un site de production extrahépatique du VHC, entièrement autonome vis-à-vis du tissu hépatique où se réplique activement le virus, existe peut-être. Mais la notion de réservoir dans les dendritiques suppose un fonctionnement intermittent de l'infection avec des périodes durant lesquelles tout signe d'infection active disparaît et le virus reste cantonné dans le réservoir. La présente section fait état des connaissances publiées relativement à la permissivité des dendritiques face au VHC.

### **3.1 Tropisme cellulaire: récepteur CD209**

Le récepteur spécifique du VHC n'est pas identifié. Plusieurs molécules membranaires sont considérées comme des récepteurs putatifs du VHC. Les glycosaminoglycanes sont des chaînes polysaccharidiques linéaires et sulfatées présentes dans de nombreux tissus et il a été rapporté que le VHC pourrait se fixer aux PBMC par l'intermédiaire de celles-ci (50). Le récepteur LDL est présent à la membrane cellulaire de tous les tissus, surtout dans le foie. Le virus est associé aux LDL dans le plasma et le VHC complexé aux LDL peut être endocyté par les récepteurs des lipoprotéines (3). La protéine CD81, de la superfamille des tétraspanines, est exprimée à la surface de nombreuses cellules (209). Sur les lymphocytes B, le complexe CD19-CD21-CD81 Leu-13 joue un rôle dans l'activation cellulaire (60,85). Sur les lymphocytes T, CD81 s'associe au CD4<sup>+</sup> et au CD8<sup>+</sup> et délivre un signal de co-stimulation avec CD3 (367,377). La glycoprotéine E2 se lie au CD81 (298) et sur les dendritiques ce récepteur putatif est localisé à la membrane plasmique en association avec le CMH-II (77,249). Bartosch *et al.* (20) ont étudié l'entrée du virus dans les cellules grâce à des pseudoparticules virales porteuses d'un complexe glycoprotéique E1E2 fonctionnel. Ils ont confirmé que l'entrée du virus était dépendante du pH, impliquant la voie de l'endocytose. Ces auteurs (21) font l'hypothèse que le VHC s'attacherait au CD81 par l'intermédiaire de la glycoprotéine d'enveloppe virale E2 et qu'il serait internalisé dans la cellule cible par le biais d'une interaction avec SR.B1 (Cla-1) (313).

Hsu *et al.* (144) ont publié des résultats cohérents avec cette ligne de pensée, c'est-à-dire que le pouvoir infectieux du VHC nécessiterait la co-expression de E1 et E2, serait pH-dépendant et la molécule CD81 ne serait qu'une sous-unité d'un complexe de récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée. Le SR.B1 est exprimé sur les monocytes et les dendritiques myéloïdes (35). Cependant la large distribution de ces récepteurs n'explique pas le tropisme restreint du VHC et permet de supposer qu'il existe un ou des récepteurs plus spécifiques et que l'interaction avec ces multiples récepteurs non spécifiques concentrerait le virus à la surface cellulaire et augmenterait la probabilité de fixation aux récepteurs spécifiques, permettant l'internalisation du virus. Ainsi, dans le foie, le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R), appelé aussi lectine hépatique, présent uniquement sur les hépatocytes, serait justement un candidat de récepteur spécifique (312).

Par ailleurs, en ce qui concerne l'interaction soupçonnée entre le VHC et les dendritiques, de récents travaux (222,223,228,278) suggèrent qu'elle pourrait être amorcée par l'internalisation par endocytose du VHC à partir du milieu extracellulaire par le biais de la lectine de type C mannose-spécifique CD209 (123) exprimée qu'à la surface des dendritiques (97). L'importance de CD209 en tant que récepteur viral spécifique est souligné par le fait qu'il lie les motifs N-glycanes riches en mannose de plusieurs autres protéines d'enveloppe virale dont notamment la gp120 du VIH (98), la protéine S du coronavirus SRAS (387) et la GP1 d'Ebola (12). Également, une série d'arguments d'ordre taxonomique et empirique viennent renforcer la notion que ce virus hépatotropique puisse démontrer *in situ* un tropisme pour les dendritiques d'origine myéloïde. Notamment, l'infection par DEN en *cis* des dendritiques humaines immatures de Langerhans ou dérivées de monocytes CD14<sup>+</sup> sanguins (135,212,380), via l'endocytose médiée par le récepteur CD209 (350), permet la réplication virale. De plus, dans le cas du VHC, Kaimori *et al* (163) confirment *in vitro* le rôle des lectines de type C mannose-spécifique dans l'entrée du virus et la réplication dans des dendritiques myéloïdes CD11c<sup>+</sup> circulantes. Ces observations démontrent le rôle que peut exercer CD209 dans le tropisme cellulaire

du VHC et permet de supporter l'hypothèse sur la nature infectieuse de l'interaction entre les dendritiques et le VHC.

### 3.2 Détection du génome viral

Des évidences partielles colligées à partir de plusieurs travaux publiés montrent l'existence de constituants viraux, dont notamment la présence d'ARN génomique parmi les dendritiques (359) et monocytes CD14<sup>+</sup> (208,284,297) circulants isolés de patients chroniquement infectés. Toutefois, ces données PCR qui sont dans la grande majorité de nature qualitative, ne permettent pas de déterminer si le virus a transféré son matériel génétique dans le cytosol suite à la fusion des membranes et de conclure sans équivoque à une permissivité cellulaire véritable puisque les séquences amplifiées peuvent aussi bien provenir de particules adsorbées à la surface ou encore s'agir d'ARN encapsidé retenu dans des phagosomes. Comme mentionné dans la première section, le VHC, lors de sa réplication, synthétise une matrice de réplication de polarité négative complémentaire au génome. La détection de cette matrice par PCR constitue ainsi l'un des seuls arguments exploitables à l'heure actuelle pour montrer que le compartiment cellulaire analysé soutient la traduction du génome et la réplication active du virus. Néanmoins, il existe, dans ces sites, une population virale autonome, distincte de celle présente dans la circulation générale (37, 69,234,259).

L'ARN de polarité négative a été détecté dans les monocytes (200,207,308). La détection de l'ARN de polarité négative n'est toutefois pas une preuve d'infection productive et ne constitue qu'un marqueur biochimique suggérant que la réplication du génome viral (qui signe des événements récents de traduction du génome) s'est déroulée jusqu'à cette étape. L'existence d'une infection répliquative pour les dendritiques n'est que peu documentée. Mellor *et al.* (243) et Goutagny *et al.* (107) ont démontré respectivement la présence d'ARN viral de polarité négative, signe d'une réplication active, au sein d'une population leucocytaire enrichie par immunomagnétisme en dendritiques CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CMH-II<sup>+</sup> périphériques chez 10 et 12.5% des cas chroniquement infectés à l'étude, ce qui laisserait suggérer qu'il y a peut-être une association répliquative avec une rare sous-population résultant dans

la dilution d'un signal PCR par les cellules décrites comme étant non-permissives *in vivo*.

Les deux phénomènes, circulation de dendritiques sanguines infectées et chronicité, sont en effet corrélés mais non strictement interdépendants. Dans certains cas, par exemple chez des chimpanzés, la circulation de dendritiques infectées et dysfonctionnelles peut être indectable alors que la virémie plasmatique reste paradoxalement très élevée (198,295). Dans la majorité des cas chez l'être humain, la présence du génome du VHC dans les dendritiques sanguines circulantes, mesurée avec les techniques sensibles de RT-PCR, est corrélée au profil évolutif et sa diminution sous traitement est associée à une restauration des fonctions immunogéniques de ces cellules (360).

En résumé, l'association entre VHC et un défaut de présentation antigénique est désormais largement documentée. Certaines études rapportent même, comme nous l'avons vu ci-haut, l'implication directe du VHC dans l'apparition de ce défaut. Ces observations sont cohérentes avec la détection du génome viral dans les dendritiques circulantes. Mais comme décrit, l'existence de tels réservoirs et les conséquences qu'ils peuvent engendrer sur le bon fonctionnement de la réponse immunitaire développée par l'hôte, bien que probable, reste, dans le cas du VHC, à démontrer d'une façon formelle. En effet, si un certain consensus s'établit quant à la présence d'ARN génomique dans les dendritiques de sujets virémiques, la conséquence immunologique de la détection de ces séquences reste très ambiguë. L'implication directe de la présence du génome ou des protéines virales dans l'apparition de ce défaut *in vivo* reste à démontrer.

#### **4. OBJET DU MEMOIRE**

Les dendritiques, qui expriment les récepteurs putatifs identifiés pour le virus, sont infectables par le VHC *in vitro* (258). Des antigènes viraux dont la Core et la NS3 ont été détectés par immunofluorescence et cytométrie dans les monocytes et macrophages infectés (32,201). Pham *et al.* (276) rapportent la détection d'ARN

génomique dans des dendritiques dérivées à partir des précurseurs monocytaires. La section deux a déjà abordé le fait que les monocytes sont des précurseurs directs des dendritiques myéloïdes *in vivo*. La nucléocapside du VHC inhibe la synthèse de l'IL-12p40 au niveau de sa transcription dans les dendritiques et macrophages (205), et inhibe l'activité de la MAPK14 (p38 $\alpha/\beta$ ) (385) et de NF- $\kappa$ B (289,328) dans des modèle d'expression ectopique. Natoli et ses collègues (303) ont mis en évidence que la phosphorylation de la Ser<sup>10</sup> de l'histone H3 catalysée par la voie MAPK14/MSK1 intervient dans l'expression des gènes inductibles comme l'IL12-p40 (225) en réponse aux signaux qui induisent la maturation chez les dendritiques en permettant la décompaction locale des nucléosomes sur les promoteurs d'intérêt. Cette décompaction est l'événement nécessaire pour qu'il y ait accessibilité du facteur NF- $\kappa$ B à ses sites de liaison au sein des promoteurs, puis transcription de ces gènes (301,302,372,373). Les résultats de l'équipe de Medzhitov (270) avec des souris MyD88KO soulignent l'importance qu'a la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les dendritiques dans l'activation des CD4 (156,271,272). On peut penser que la signalisation de cytokine inflammatoire est exigée pour l'entretien *in vivo* d'une population effectrice T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> capable de négocier la protection à long terme contre l'hépatite C persistante, sans quoi de nouvelles réponses CD8<sup>+</sup> ne pourraient être générées contre des mutants d'échappement.

L'inhibition des fonctions des cellules composant le système immunitaire est un mécanisme connu par lequel les virus éludent les défenses de l'hôte pour persister de façon chronique (pour une revue, consulter 133). L'inhibition de la transcription des gènes pro-inflammatoires inductibles comme l'IL-12 par la Core dans des dendritiques peut dès lors être à la base de la stratégie exploitée par ce virus pour induire la perte des réponses protectrices et favoriser sa persistance chez l'hôte dans la mesure où elle neutralise le pouvoir stimuloire des dendritiques. Ainsi, faire le pont entre le phénotype apparent IL-12-déficient *in vivo* chez les cas chroniques et la nucléoprotéine Core du VHC par l'entremise d'une infection des dendritiques représente un modèle pertinent pour expliquer la perte, lors du cours normal de la phase aiguë, des cellules effectrices fonctionnelles VHC-spécifique produisant de

l'IFN- $\gamma$  qui paraissent si critique à la défense de l'hôte contre cette maladie. Aussi, la caractérisation de réservoirs extrahépatiques au sein de cellules immunitaires demeure d'actualité puisque nous ignorons toujours la nature définitive de l'interaction particulière du virus avec les dendritiques circulantes *in vivo* et s'il y a, proprement dit, établissement d'un réservoir qui pourrait exercer une conséquence délétionnelle sur l'activation des réponses lymphocytaires T VHC-spécifique.

L'objet de ce mémoire est donc de quantifier et de caractériser l'interaction du VHC avec les dendritiques afin de clarifier notre compréhension de sa persistance chez l'hôte infecté.

## CHAPITRE II

### ARTICLE SCIENTIFIQUE

L'article scientifique qui suit fait état des résultats obtenus en lien avec la caractérisation d'un réservoir d'importance immunologique qui se constitue dans les cellules dendritiques périphériques chez des patients virémiques sans thérapie antivirale. Cet article sera soumis à la revue *Journal of Immunology*.

## **Human dendritic cells as an extrahepatic viral host of immunological relevance targeted by Hepatitis C infection**

Ian Gaël Rodrigue-Gervais (1,4,5), Loubna Jouan (2,4), Geneviève Beaulé (1,4,5), Bernard Willems (3,4), Marcelo López-Lastra (6), Rafick-Pierre Sékaly (1,4,5) and Daniel Lamarre (2,4)

*<sup>1</sup>Laboratoire d'Immunologie, <sup>2</sup>Laboratoire d'Hépatogastroentérologie, <sup>3</sup>Division d'hépatologie, <sup>4</sup>Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec H2X 1P1, Canada <sup>5</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec H3C 3J7, Canada <sup>6</sup>Laboratorio de Virología Molecular, Departamento de Pediatría, Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile*

**\*\*Corresponding author:**

Daniel Lamarre


Centre de recherche du CHUM, Hôpital Saint-Luc

264, boul. René-Lévesque Est, bureau 312

Montréal (Québec) H2X 1P1

Tél: (514) 890-8310-35258

Télécopieur: (514) 412-7314



Running title: Subversion of TLR functions by HCV

[Abstract: 189 words; Text: 31 716 characters (5 479 words)]



## Abstract

Characterization of extrahepatic viral reservoirs that exert an inhibitory pressure on peripheral dendritic cell function is a key requirement to the investigation of what underlies inadequate host HCV-reactive T lymphocyte responses and failure to resolve HCV infection in humans. Here we quantitatively and qualitatively analyzed dendritic cell function through quantification of intracellular HCV RNA levels in conjunction with multiparameter flow cytometric analysis of cytokine expression in a cohort of untreated long-term viremic HCV-infected patients. We show in this study that *ex vivo* isolated blood dendritic cells carried the highest intracellular viral load of all peripheral subpopulations tested. In these HCV-infected individuals, expression of IL-12 and TNF $\alpha$  decreased in a HCV RNA dose-dependant fashion whereas PBMCs not harboring virus displayed expression levels similar to uninfected donors, suggesting that inhibition of expression is directly linked to the levels of HCV RNA in carrier cells. Taken together, these data indicate that dendritic subsets constitute a viral host actively targeted by HCV *in vivo*. The persistent impairment of these "infected" cells may result in defects in dendritic-mediated adaptive immune functions that can affect the immunological outcome to HCV.

## Introduction

Although hepatitis C virus (HCV) is one of the most widespread chronic infectious disease, its natural pathogenesis and the mechanisms pertaining to viral persistence are still ill understood. Numerous studies, conducted both in chimpanzees and humans, suggest that sustained HCV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> responses are essential to ensure spontaneous viral clearance during the acute phase of infection (Cooper et al., 1999; Lechner et al., 2000; Shoukry et al., 2003; Thimme et al., 2001; Thimme et al., 2002). In particular, recurrence of viremia has been associated with a loss of HCV-specific CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T helper cell populations (Gerlach et al. 1999; Grakoui et al., 2003). Several reports have shown that TLR-responsive dendritic cells are the key initiators that provide all of the necessary cognate interactions to control T cell fate during primary immune response and memory generation (Kobayashi et al., 2003; Pasare et al., 2003; Pasare et al. 2004; Schnare et al., 2001; Serra et al., 2003 Spörri et al., 2005; Yang et al., 2004). Given the desensitization of TLR-responsiveness during HCV infection (Anthony et al., 2004; Kanto et al., 2004) and its restoration following antiviral therapy (Tsubouchi et al., 2004b), it is currently believed that viral interference with normal functions of dendritic cells could account for declining immune responses in HCV-infected patients. However, *in vivo* data substantiating this view are scarce and the physiological role of these cells has mostly been inferred from studies with cytokine-driven culture systems.

Organizing into a unifying hypothesis the current knowledge concerning the fate and function of dendritic cells in the setting of HCV infection is a difficult task mainly because the field has yielded controversial and conflicting results. Indeed, several groups have suggested that dendritic cells are not compromised during HCV infection and that the observed defects are rather a passive consequence of virus-associated pathologies (Larsson et al., 2004; Longman et al., 2004; Rollier et al., 2003). Nevertheless, viral sequences and replicative HCV RNAs have been detected in dendritic cells isolated from infected patients (Bain et al., 2001; Goutagny et al., 2003; Mellor et al., 1998; Navas et al., 2001; Tsubouchi et al., 2004a). The role that HCV plays in the process of desensitization of TLR-signaling characteristic of

progressive infection (Anthony et al., 2004), and the degree of reversal in dendritic cells that do not harbor virus, has yet to be fully elucidated. Therefore, a better understanding of the consequences of an interaction with HCV on the numbers and functional abilities of these cells is important.

To address the role HCV infection exerts on the functioning of peripheral dendritic cells, we characterized the nature of the TLR-signaling defects in long-term untreated viremic patients. We report that the frequency of cytokine-expressing dendritic cells of myeloid origin correlated to the detection of viral genomic RNA. In agreement with these findings, no loss of expression was observed in any of the peripheral cell populations recovered from patients defined by the absence of viral genetic material within their cells. These results strongly support the notion that the presence of HCV directly impairs myeloid dendritic cell immunogenic functions. Consequently, this study provides an alternative view to that proposed by others which ignores the role that dendritic cells have in orchestrating the immune response decisions towards HCV.

## Methods

### *Chemical and immunological reagents*

The following surface and cytokine antibodies were purchased from BD Pharmingen: CD3 (UCHT1), CD4 (RPAT4), CD4 (SK3), CD11c (B-ly6), CD14 (M5E2), CD16 (3G8), CD19 (HIB19), CD19 (SJ25C1), CD33 (P67.6), CD83 (HB15e), CD86 (2331Fun-1), CD123 (9F5), HLA-DR (L243), IL-6 (MQ2-6A3), IL-12p40/70 (C11.5), TNF- $\alpha$ (11) and CCL3/MIP-1 $\alpha$  (11A3). CD62L (DREG56) and BDCA2 (AC144) were from Immunotech and Miltenyi Biotec respectively. Cascade yellow-streptavidin was from Molecular Probes. DMSO, *E. coli* 055:B5 lipopolysaccharide, RPMI-1640, DMEM, fetal calf serum, recombinant human IL-4 and phytohemagglutinin A were from Sigma. SB202190.HCl was from Calbiochem. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly I:C) and Ficoll-paque Plus were from Amerhsam Biosciences. Penicillin-streptomycin, L-glutamine, nonessential amino acids, sodium pyruvate, geneticin and HEPES were all purchased from Gibco Life Technologies.

### *Patients and control individuals*

Blood samples were obtained from 21 healthy volunteers and 27 untreated HCV-infected patients enrolled in the drug addiction and experimental units of the Saint-Luc Hospital of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Twelve of the samples analyzed in this study (4 HCV-infected and 8 healthy) originated from apheresis products obtained through the Immunodeficiency Service and Division of Hematology of the Royal Victoria Hospital. A summary of the clinical and demographic characteristics of the patients studied is shown in Supplemental Table 1. As per Canadian health guidelines, none of the IDU patients started antiviral therapy either prior to enrolment or during the course of this study. Clinical protocols conformed to ethical guidelines of the authors' institutions. Samples were obtained with the informed consent of the subjects.

### *HCV quantification*

Primers specific for the 5' untranslated region of HCV, and the human GAPDH gene were defined on strain H77 and human sequence (GenBank accession numbers

AF011751 and BC020308, respectively) (Supplemental Table 2). The amplicon for HCV, defined by the 5'/3' out primers, amplified from the p90/HCV FL-long pU plasmid (Kolykhalov et al., 1997), was cloned into pCR2.1 Topo vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) together with the GAPDH amplification product (amplified from human lymphocyte RNA using GAPDH 3'/5' out primer pair). This plasmid, amplified in the same run as the experimental samples, was used to generate standard curves for real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR)-based assay. Parallel quantification of HCV together with the GAPDH amplicon was performed for each sample with the LightCycler technology (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ). Cellular RNA was extracted using RNAeasy Mini columns (Qiagen, Valencia, CA) as per the manufacturer's instructions and was reverse-transcribed for 30 min. Strand-specific quantification was performed using ThermoScript reverse transcriptase (Invitrogen) whereas absolute quantification experiments were carried out with Omniscript reverse transcriptase (Qiagen). After reverse transcription, PCR amplification was performed for HCV or GAPDH (5 min initial denaturation at 95°C, 45 s at 94°C, 60 s at 60°C, 2 min at 72°C for 20-22 cycles) using the outer 3'/5' primer pairs. The linearity of this first-round assay was demonstrated in duplicate experiments up to 22 cycles when using a maximum of 1 µg RNA (data not shown). These PCR conditions were used for all subsequent experiments. PCR conditions in the LightCycler experiments, performed on 1/10<sup>th</sup> of the initial PCR, were as follows: 1 min initial denaturation at 95°C, 1 s at 95°C, 10 s at 60°C, and 15 s at 72°C for 40 cycles. Fluorescence measurements were performed at the end of the annealing steps. HCV and GAPDH LightCycler quantifications were performed in independent experiments with their respective first round, serially diluted standard curve. This highly sensitive nested quantitative RT-PCR assay allows the detection of ten copies per PCR reaction for each DNA amplicon. HCV was quantified in duplicate at the RT level for all studied samples. The results are expressed as either absolute numbers of HCV per 10<sup>6</sup> cells or as arbitrary units normalized to GAPDH. Interexperimental variation was always lower than 10%. Six healthy blood donors tested failed to give detectable signals for HCV RNA (data not shown).

### *Flow cytometry*

Peripheral blood mononuclear cells were treated with a stimulus and prepared for flow cytometry. Brefeldin A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) was added for intracellular cytokine detection in the last 5 h. For multiparameter surface and intracellular staining, cells were seeded into 96 conical wells, and cytometric staining was done by surface-staining the cells in buffer A (PBS, pH 7.4, 4% FCS and 0.09%  $\text{NaN}_3$ ), fixing them in 1.5% formaldehyde, permeabilizing them in buffer B (0.2% saponin in buffer A) and resuspending them in buffer C (PBS with 1% formaldehyde and 0.5 mM EDTA). Cells were washed twice in buffer A between stains (30 min surface; 30 min intracellular) and fixation (15 min). All antibodies in this study were pre-titered. Six-color (or more) flow cytometry data acquisition was made with a LSR II flow cytometer using the FACS DiVa software (Becton Dickinson, LaJolla, Ca). Cytokine clustering analysis was done as described (Irish et al., 2004) by inputting the  $\log_2$  ratio of fluorescence intensity values of flow cytometric staining into MeV array software (<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>). All quantification of fluorescence intensity values for intracellular stains was obtained by computation of the mean from the following equation:  $\log_2 (\text{MFI}^{\text{Stimulated}}/\text{MFI}^{\text{Basal}})$ . A minimum of  $5 \times 10^5$  events in the live cell gate, as defined by forward and side scatter, was accumulated for each sample. For multiparameter flow cytometric analysis of circulating dendritic cell frequencies, we used a panel of nine different directly conjugated monoclonal surface antibodies (BDCA2/CD16 FITC, CD14 PE, CD123 PECy5.5, CD62L ECD, CD3/CD19 PE-Cy7, CD11c APC and CD4 APCCy7) in addition to staining with biotinylated anti-HLA-DR followed with Cascade yellow-streptavidin.

### *Cell lines, primary cell isolation and cell stimulations*

Huh7 and replicon carrying clone 9-13 were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FCS, 1% PSQ (100 units/ml of penicillin and streptomycin and 2mM L-glutamine), 1% nonessential amino acids and 500  $\mu\text{g}$  of G418 per ml for clone 9-13. Fresh PBMCs were separated from whole blood by Ficoll-paque density gradient centrifugation and cultures were performed as described previously (Ho et al., 2002). In brief, PBMCs were seeded in 75  $\text{cm}^2$  culture flasks (BD Biosciences) at

a concentration of  $10 \times 10^6$  cells per ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 10 mM HEPES buffer, 1% PSQ and 1% nonessential amino acids, cultured at 37°C 5% CO<sub>2</sub>, and used within 12–16 h of isolation for all stimulations and sorting experiments. PBMCs were stained with directly conjugated anti-CD19-FITC, anti-HLA-DR-PerCP, anti-CD3-APC, and anti-CD14-APCCy7 cell surface antibodies and sorted. In cell sorting experiments, about  $1 \times 10^5$  blood dendritic cells were sorted from  $1 \times 10^8$  cells on a FACSAria using DiVa v4.0 software (Beckton Dickinson). Subpopulation purity was always above 98%. For cytokine production experiments, cells were stimulated for 6 h in 96 U-bottomed deep-well plates ( $1.25 \times 10^6$  cells per well) with either 0.1 µg/ml LPS, or 25 µg/ml poly I:C final concentration prior to cytometric staining and analysis. For strand-specific quantification of viral RNA, PBMCs were mitogen-stimulated as described (Pham et al., 2004) with some modifications. Briefly, PBMCs were depleted of adherent cells, distributed evenly in 24-well plates (Falcon) and cultured in RPMI-1640 10% FCS with 3 µg/ml of PHA and 200 U/ml of IL-2 at  $1 \times 10^6$  cells per well.

### *Statistics*

Statistical analysis (Student's t-test, one-way ANOVA, Tukey's test, Fisher exact probability test, Spearman's correlation test) was performed using the Vassar website (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>) and GraphPad Prism software v3.0. In order to analyze normally distributed populations of samples, Student's t-tests were performed on log transformed values. An  $r$  value  $\geq 0.3$  or  $\leq -0.3$ , and a  $p$  value  $\leq 0.05$ , were considered significant.

## Results

### *HCV-carrying Immune Cells in the Periphery*

In trying to relate HCV interaction with defects in function of dendritic cells, we began with prior evidence that PBMCs contain immune subsets that can act as extrahepatic reservoirs, some of which may be capable of replicating HCV. Because in all likelihood, reservoirs for HCV in immune cells may be associated with a relatively rare cell subset, resulting in dilution by unpermissive cells, we required a sensitive assay that remained quantitative for high throughput analysis of rare cell samples from infected patients. HCV RNA molecules can be quantified in peripheral blood using nested quantitative real-time PCR technology (see Supplemental Figure S1). Duplicate estimates of intracellular HCV RNA in a panel of 16 samples demonstrates the reproducibility of such quantitative assessment (Spearman's rank  $r=0.991$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig.S1, a). Moreover, this technique allows accurate quantification of both virus genomic RNA and negative strand, the obligatory replicative-intermediate generated during the first steps of viral replication (Fig.S1, b and c).

We document that HCV RNA was carried in PBMCs in 11 (84.6%) of the 13 HCV-infected individuals tested. Seven out of the 13 PBMC samples (as availability of material permitted) were evaluated for accumulation of HCV RNA to demonstrate that reservoirs present within PBMCs exist independently of unspecific interactions (i.e. phagocytosis, Fc receptor surface-binding) that may arise in the periphery. PBMCs from infected individuals ( $n=7$ ) were activated *in vitro* using PHA and IL-2 (Pham et al., 2004). HCV RNA levels were measured over one week. As demonstrated in Figures 1a and 1b, HCV RNA levels do not remain constant in short-term mitogen-stimulated culture, fluctuating at various time points during this period, indicating possibly a self-sustained maintenance in culture since the observed variations are inconsistent with a simple cumulative dilution effect as the cell population expands if trace replication was not occurring in parallel. Indeed, viral RNA is still readily observed after one week and, in selected cases, appears to have modestly increased after an initial downward trend. Six out of the seven patients



investigated showed similar trends, clearly suggesting that our observations are accurate as they are not restricted to a particular individual. Furthermore, while the levels of genomic RNA present decreased to undetectable levels in parallel with the undetectability of the negative strand (see Fig.1, b P13), the antisense replication template was correlated to sample fluctuations, in agreement with similar data on primary hepatocytes and intrahepatic B cells (Castet et al., 2002; Sansonno et al., 1998). Short-term persistence of HCV RNA in proliferating cells from chronically infected patients (Fig.1) is compelling evidence of RNA molecules that replicated in self-sustaining ways (Bronowicki et al., 1998; Morsica et al., 1999).

These findings highlight that immune cells in the periphery interact with the virus at levels well beyond those expected for an unspecific viral host. Our observations further confirm, in that respect, that there is a distinct relationship between HCV and PBMCs as was previously suggested by compartmentalization and *in situ* hybridization studies (Roque Afonso et al., 1999; Ducoulombier et al., 2004; Moldvay et al., 1994; Muratori et al., 1996; Okuda et al., 1999; Sansonno et al., 1996). Consequently, we used the quantitative detection of genomic HCV RNAs as a reliable surrogate marker of a specific interaction between virus and immune cells of HCV-infected subjects in following experiments.

#### *Circulating Dendritic Cells Harbor HCV RNA*

To further dissect the nature of the immune subsets that act as reservoirs for HCV, PBMCs from HCV-infected patients were sorted with 4-color flow cytometry for direct identification of the cellular compartments containing the highest numbers of viral transcripts relative to levels in the original unseparated samples. Quantification of intracellular viral RNA titers in sorted peripheral blood immune subsets (n=5) confirmed that HCV RNA is found within the CD3<sup>-</sup>14<sup>-</sup>19<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> B lymphocyte compartment (Sung et al., 2003; Zehender et al., 1997), but were not significantly different (Student's t-test, p=0.23, Mann-Whitney, p=0.22) than levels within total PBMCs (log<sub>10</sub> median 4.0 and 3.6 per 10<sup>6</sup> cells respectively) indicating that this subset is not the predominant host for HCV in the periphery (Fig.2). Notably, we found statistically significant differences (Student's t-test, p=0.0071, Mann-Whitney,

$p=0.0079$ ) in levels in peripheral T cell subpopulations as defined by the expression of CD3 as compared to PBMCs, with the latter having higher copy numbers ( $\log_{10}$  median 2.7 and 3.6 per  $10^6$  cells respectively), supporting the notion that T cells do not constitute a host for the virus. Ex-vivo detection of viral RNA in peripheral dendritic cells was consistent with other findings showing that this cellular compartment unambiguously carries virus in vivo (Goutagny et al., 2003; Mellor et al., 1998; Tsubouchi et al., 2004a). Indeed, the bulk of the detected RNA is distributed between the MHC class II-positive  $CD3^{-}14^{+}19^{-}$  monocyte ( $\log_{10}$  median 4.61, range 4.04-5, mean 4.6 per  $10^6$  cells; t-test  $p=0.01$ , Mann-Whitney  $p=0.03$ ) and  $CD3^{-}14^{-}19^{-}$  dendritic cell ( $\log_{10}$  median 5.03, range 4.89-5.15, mean 5.02 per  $10^6$  cells; t-test  $p=0.0009$ ; Mann-Whitney  $p=0.007$ ) compartments in contrast with a set of observations reported by a previous study (Boisvert et al., 2001). Thus, the consistent presence of higher genomic HCV RNA levels only within peripheral dendritic cell sub-populations, which represent a rare cell type in blood (<1%), in all five chronically infected patients studied, highlights their role as a cell host for the virus.

**Multidimensional Single Cell Profiling Reveals Disease Subgroups with Distinct TLR-mediated Signal Transduction Profiles**

Next, we sought to determine if the detected HCV RNA exerted influence on signal transduction of TLR3 and TLR4 by quantitative analyses of multiple inflammatory cytokines and chemokines by flow cytometry in  $CD14^{-}33^{+}HLA-DR^{+}$  circulating myeloid dendritic cells. Parallel samples from the same consenting HCV-infected donors were used for intracellular cytometry and RNA quantification to show that desensitization of TLR-signaling is restricted to the HCV RT-PCR<sup>+</sup> patients' group, hence correlating with the presence of viral RNA within immune cells (Fig.3-4). Because of the limited availability of cells from certain patients, total PBMCs were systematically analyzed for viral quantification without further separation into subsets. This approach is presumed to have no substantial impact on the results and conclusions presented herein since only traces of viral sequences are expected to be detected in different subsets when HCV RNA is absent from circulating PBMCs.

To visually simplify the data regarding TLR-responsiveness in dendritic cell samples from HCV infected patients, we built a response panel showing the relative fold increase of IL-6, IL-12p40, TNF $\alpha$  and CCL3. We determined the fold increase by calculating the  $\log_2$  difference in median fluorescence intensity (MFI) of stimulated sample divided by unstimulated sample (Fig.3). Each square in the grid corresponds to a flow cytometry file that contained a minimum of 500,000 cells stimulated for 6 h with LPS (TLR4) or poly I:C (TLR3). In an attempt to relate the presence of HCV RNA to signaling outcome, we computed cytokine induction profiles by subtracting donor sample means and grouped them with unsupervised hierarchical clustering algorithms used in microarray gene expression analysis to investigate whether signaling networks showed mechanistic similarities to each other that corresponded with unresponsiveness. Unsupervised clustering allowed two disease subgroups to be identified for HCV patients, and each was termed a distinct signaling cluster (SC) as based on the primary nature of the signaling profile of the cluster (Fig.3, a). SC-low (SC-L, 4/7) displayed inhibited or little cytokine expression in response to TLR induction (low IL-12p40 and TNF- $\alpha$ ) while SC-normal (SC-N, 3/7) displayed intense signaling and intermediate basal expression level states. The basal states were represented relative to the minimum among the HCV-infected patients tested to illustrate the differences in the basal state across all samples. However, all signaling nodes remained activable following TLR stimulation as we observed expression above levels seen in the basal state (see Fig.4, a). Ex vivo expression profiles obtained with intracellular antibodies to IL-12p40 are consistent with other observations showing that circulating myeloid dendritic cells have extensive reductions in this cytokine's levels in the context of HCV infection upon TLR3 stimulation (Anthony et al, 2004). IL-6 and CCL3 levels in both disease sub-groups were similar to those found in healthy donors (see Fig.3, a).

Subsequent testing for correlation with the Fisher exact probability test (Fig.3, b) showed that patient samples that displayed low TLR responsiveness contained detectable viral RNA within their total PBMCs whereas samples with normal

signaling lacked such HCV RNA ( $p=0.02$ ). In HCV-infected individuals, the expression of IL-12 and TNF $\alpha$  is RNA-dependant (Spearman's  $r=-0.860$ ,  $p=0.0003$  and  $r=-0.620$ ,  $p=0.03$ , respectively; Fig.3, c), suggesting that inhibition of expression is directly linked to the levels of HCV RNA in carrier cells. The respective expression of these two cytokine within dendritic cells are thus similarly affected in cells harboring HCV RNA. These subgroup's signatures indicate that both quantitative and qualitative differences in signaling through TLRs are present in dendritic cells carrying virus.

**Infection-induced Decrease in Cytokine Expression is Associated with Detectability of Carrier PBMCs**

Because transient ectopic expression of HCV proteins was demonstrated to have a potent inhibitory effect on TLR-mediated signaling (Foy et al., 2003; Sarobe et al., 2002), we used further statistical analysis to assess the significance of the observed correlation between viral RNA and inhibited TLR signal transduction. The cytokine profile of patient samples with viral RNA ( $n=4$ ) were compared with patient samples that had no detectable RNA ( $n=3$ ) and healthy donors ( $n=7$ ) (Fig.4). The cytokine response for both TLR pathways analyzed differed very little between donors and the two disease subgroups ( $n=14$ ,  $\sigma^2 < 0.05$ ), so we compared the responsiveness in samples irrespectively of the nature of the TLR ligands used as stimuli. IL-12p40 levels following TLR engagement correlated significantly with the detectability of viral RNA within PBMCs ( $p < 0.0001$ ), and all SC-L samples harboring virus displayed lower expression levels than age-matched SC-N (median  $\log_2$  ratio of 0.067 and 1.42 respectively) (Fig.4, d). TNF- $\alpha$  expression was significantly ( $p=0.0006$ ) lower in SC-L patients (median 1.89, range 1.22-2.26, mean 1.81) as compared to age-matched SC-N patients (median 3.27, range 2.3-4.0, mean 3.18) (Fig.4, e). The measured profiles for these two cytokine are very similar in both SC-N patients and uninfected subjects. Other node responses were not observed to differ in patients' subgroup relative to healthy donors and each other (data not shown). These results demonstrate that both these cytokine's expression are intimately linked to the ability to detect viral RNA in circulating blood dendritic leukocytes. In particular, there is

strong linkage between the responsiveness of dendritic cells to this set of TLR stimuli and detection of virus genetic material, suggesting that certain viral elements inhibit Toll-mediated danger signaling.

**Reduction in Circulating Frequencies of Dendritic Cells following HCV-infection**

Prior studies have proved unable to distinguish between an intrinsic functional defect in dendritic cells or simply their numerical disappearance from the periphery. Indeed, decreased IL-12 production might be accounted for by either a loss of the producing cells or rather their inability to synthesize normal levels. However, the cytometry analysis method used here allows a quantitative evaluation of cytokine expression in single cells even in patients either demonstrating heightened immune activation due to ongoing HCV infection or numerical deficiencies in circulating dendritic cell repertoires. Nevertheless, to circumvent some of the inherent interpretational difficulties encountered when attempting to assess dendritic cell function even by cytometry, we enumerated APC subsets in blood using ten immunophenotypic surface markers simultaneously by 8-color flow cytometry.

As demonstrated in Figure 5, HCV-infected individuals had lower frequencies of circulating CD11c<sup>hi</sup>14<sup>-</sup> myeloid dendritic cells as compared with healthy controls (median frequencies 0.229±0.026% and 0.427±0.03% in patients and controls respectively) (Fig.5, b). This decrease, however, borders statistical significance (t-test p=0.05, Mann-Whitney p=0.07) and brings further support to the view that myeloid dendritic cells are minimally reduced (1.6-fold) in the setting of HCV infection in comparison to CD123<sup>+</sup> cells (Anthony et al, 2004). Indeed, significantly lower frequencies (2.4-fold) of BDCA2<sup>+</sup>CD123<sup>hi</sup> plasmacytoid dendritic cell precursors equally characterized the same patients (median 0.055±0.014% and 0.184±0.023% in patients and controls respectively; t-test p=0.003, Mann-Whitney p=0.007). We found no evidence in the patients' group that blood distribution patterns for the CD14<sup>low</sup>11c<sup>+</sup>16<sup>+</sup>62L<sup>-</sup> monocyte subset were altered (median 0.335±0.029% and 0.415±0.093% in patients and controls respectively; data not shown). By contrast, a drop in frequency for CD14<sup>hi</sup>11c<sup>+</sup>16<sup>-</sup>62L<sup>+</sup> monocytes was observed (median

3.78.±0.74% and 6.048±0.93% in patients and controls respectively; t-test p=0.02, Mann-Whitney p=0.01, data not shown).

These results demonstrate that in most cases, frequencies of circulating dendritic cells and precursor populations, as measured by cytometry, tend to be decreased during HCV-infection. These two variations (functional and numerical) translate into a strong decrease in the levels of IL-12p40 and TNF $\alpha$  in SC-L patients as compared to any other group. However, our data suggest that there is an intrinsic dysfunction within dendritic cells even before they disappear from blood. Furthermore, the changes in frequencies reported here and in recent studies may in fact originate from enhanced relocalization under inflammatory conditions and not as a consequence of virus-induced impaired function.

## Discussion

We observed that defects in dendritic cells from HCV-infected patients are linked to discernible patterns in TLR signal transduction networks. This allowed us to map signal inhibition in the myeloid subset within individual patient samples by clustering patients based on signaling outcome and ultimately discover that expression levels of certain inflammatory cytokines were significantly linked with the existence of immune viral reservoirs in blood ( $p=0.02$ ). These data indicate that HCV-containing dendritic cells in the periphery are functionally distinguishable from those that do not contain HCV RNA.

In the majority of HCV-infected patients, dendritic cell frequencies were diminished (Fig.5), in agreement with previous reports (Anthony et al., 2004; Murakami et al., 2004; Kanto et al., 2004). It has been argued that deficits in circulating APC frequencies, reflecting peripheral deletion in the setting of chronic viral infections, like HIV, is a measure of virus-induced impaired function and may participate in the functional loss of virus antigen-specific T cells (Donaghy et al., 2003; Jung et al., 2002). It is intriguing that the frequency of  $CD14^{hi}11c^{+}16^{-}62L^{+}$  monocytes but not that of  $CD14^{low}11c^{+}16^{+}62L^{-}$  was similarly decreased in HCV-infected individuals, compared with control subjects ( $p=0.02$ ). This is consistent with earlier studies in mice that illustrated that inflammation (peritonitis) is sufficient to appreciably modify the overall peripheral frequency of the inflammatory monocyte subset ( $CD14^{hi}16^{-}62L^{+}$ ), established and maintained prior to inflammation (Geissmann et al., 2003). In contrast, the distribution pattern of the  $CD16^{+}$  monocyte subset appears only slightly affected by inflammation (Ancuta et al., 2003), as most of these cells remain in blood ( $p=0.80$ ). Accordingly, this finding leads us to conclude that it is not the total output of dendritic cells which is declining (Kanto et al., 2004), but rather that the decrease in the peripheral frequency is directly reflective of inflammation, as might be expected in an infection. This is in accordance with the proposition that it is their relocalization into secondary lymphoid organs and liver which numerically accounts for the substantial decline observed (Wertheimer et al., 2004).

Differences in HCV RNA numbers between blood subsets can be expected, because the HCV-rich cells may become represented in the total population in different proportions depending on whether particular lineages prove more adequately suited to serve as hosts for the virus. In accordance with this idea is the finding that the levels observed in sorted blood dendritic cells imply that in viremic treatment-naive patients, dendritic cells are not only much richer in HCV than any other immune subset, including the bulk of the B cell population ( $p < 0.05$ ), but also constitute an immunologically relevant host. That is, functional impairment is not observed for patients without HCV-carrying PBCMs (Fig.3-4). In fact, in HCV-infected patients with documented immune reservoirs, IL-12p40 expression was 21-fold lower than in age-matched seropositive patients which lacked HCV-containing PBCMs (Fig.4, b). In the same individuals, dendritic cell frequency was only reduced two-fold (Fig.5, b). It is thus clear that the observed deficiencies in cytokine production are not influenced solely by the dilution effect of the remaining blood dendritic cells. Indeed, such a decrease, by itself, would have resulted in a normal production output on a per cell basis, not lower. Rather, the reduced levels in dendritic cells containing HCV may be a consequence of an intrinsic defect, reflective of virus-mediated inhibition acquired *in vivo*.

For example, A52R, produced as part of the life cycle of vaccinia virus, is known to inhibit TLR signal transduction along the IRAK2-TRAF6-IKK axis (Harte et al., 2003). Thus, an important implication of our analysis, in conjunction with earlier studies in mice and humans (Hiasa et al., 1998; Large et al., 1999; Sarobe et al., 2002; Sarobe et al., 2003), is that desensitization of TLR-signaling could be caused by virus protein expression in dendritic cells. Accordingly, cytokine expression inversely correlated with HCV RNA levels in a dose-dependent way (Fig.3, c, and d). Moreover, TLR3-mediated activation of NF- $\kappa$ B was inhibited in HEK-293T cells transiently expressing full-length (1-191) or mature (1-173) HCV Core proteins (I.G.R.G, G.B. and D.L., unpublished data), lending support to the idea that virus-derived gene-products might be implicated directly in silencing pro-inflammatory



cytokine expression through an inhibitory mechanism which is yet to be clearly defined in quiescent HCV-carrying dendritic cells.

Recently, HCV Core protein was shown to induce activation of STAT3 by directly interacting with its linker region at residues 465-585 and permitting phosphorylation of Y705 independently of the JAK pathway (Yoshida et al., 2002). In that study, the whole HCV genome induced STAT3 activity at higher levels than with Core alone, in agreement with prior findings (Gong et al., 2001). STAT3-deficient dendritic cells have been shown to produce increased levels of IL-12 and CCL5, which are involved in restoring responsiveness of tolerant CD4<sup>+</sup> T cells as well as in reversal of systemic tolerance (Cheng et al., 2003). Indeed, constitutively active STAT3 has been demonstrated to block TLR4-induced recruitment of NF- $\kappa$ B to IL-12p40 promoter and expression of the relevant gene mRNA (Hoentjen et al., 2005). Furthermore, macrophages and dendritic cells lacking *Socs3* or carrying a mutation in the SOCS3-binding site (Y759F) of gp130, show hyperactivated STAT3 (Croker et al., 2003; Lang et al., 2003), suppress TLR4-induced TNF $\alpha$  production (Yasukawa et al., 2003), and are less capable of activating T cells than are wild-type dendritic cells (Kubo et al., 2003). It is not surprising then, that STAT3 activity is decreased during normal maturation, and that terminally differentiated mature dendritic cells have lower levels of STAT3 activity (Nefedova et al., 2004), since the decision between activation versus tolerance appears to rely on the active status of STAT3 in those APCs, with tolerance being reversed when STAT3 signaling is blocked (Takeda et al., 1999; Wang et al., 2004; Welte et al., 2003).

The shared functional characteristics between SOCS3KO mice and HCV-carrying dendritic cells raises the interesting possibility that STAT3 may represent the signaling pathway linking TLR inhibition to HCV in the latter. Whether STAT3 is important in the development of the observed defects in HCV-carrying dendritic cells needs to be determined. Higher flow cytometry resolution with additional TLR stimuli, cell permeable STAT3 phosphopeptide inhibitors (Turkson et al., 2001) and

downstream STAT3 phospho-readouts could be used to generate the additional data that would provide a mechanistic insight to answer this question.

The impeded cytokine production phenotype displayed by HCV-carrying myeloid dendritic cells probably converts a T cell encounter into a tolerizing event, the default outcome that typifies antigen-presentation in MyD88KO (Pasare et al., 2003) and TRAF6KO (Kobayashi et al., 2003) mice, which are incapable of producing inflammatory cytokines upon TLR engagement (Kaisho et al., 2001; Kawai et al., 1999). (Pasare et al., 2004) have demonstrated that TLR-induced cytokine expression is required for CD4<sup>+</sup> memory differentiation but not for activation of established memory T cells at the recall stage, consistent with prior findings that showed that memory's activation threshold is less stringent as it is less dependent on costimulatory signals (London et al., 2000). In addition, signaling via the IL-12Rβ1-chain is required in humans for accumulation of memory CD4<sup>+</sup> T cells (Cleary et al., 2003). In accordance with this view is the finding of a relationship between TLR3-induced IL-12 production and HCV-specific T cell frequency (Anthony et al., 2004). Furthermore, the latter combined with the demonstrated ability of plasmacytoid cells to expand antigen-specific memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Fonteneau et al., 2003; Lore et al., 2003), while they remain less efficient than myeloid dendritic cells in priming antigen-specific naive T cells, notably CD4<sup>+</sup> (Krug et al., 2003), even when matured through TLR9 or virus interaction (Bjorck et al., 2001; Fonteneau et al., 2004; O'Keeffe et al., 2002; O'Keeffe et al., 2003), provides a plausible explanation to earlier observations of decreased priming from the naive T cell pool (Keeffe et al., 1998; Wiedmann et al., 2000) and preservation of recall responses to other viruses such as influenza and CMV in HCV-infected individuals (Kanto et al., 1999; Longman et al., 2004; Lucas et al., 2004). This relates well with the demonstration that in vitro, plasmacytoid cells prove to be an ineffectual viral host for HCV in contrast with myeloid dendritic cells, which internalize virus and carry out preliminary steps in genome replication (Kaimori et al., 2004). This possibility, however, needs to be reexamined in vivo in future studies.

In summary, the present data suggests that HCV exerts profound inhibitory effects on functioning of "infected" myeloid dendritic cells, perhaps hindering the development of adaptive immunity. This, to the best of our knowledge, is the first evidence of any quantitatively important interaction between HCV and blood dendritic cells, and actively supports an immune evasion mechanism that disrupts TLR signaling pathways in these cells to foil adaptive immunity. As such, our observations lend themselves well to the currently prevailing model (Shoukry et al., 2004) in which inadequate and waning virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell help is responsible for the failure of CD8<sup>+</sup> T cells to keep pace with the evolution of MHC-I escape mutants (Grakoui et al., 2003; Timm et al., 2004) and avoid functional anergy onset (Guener et al., 2001; Wedemeyer et al., 2002). We bring forward a plausible and "exquisitely" specific mechanism to account for the failure to generate and maintain long-term HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell memory responses, and thus, add further support to the model by placing dendritic cells as a crucial intermediary between HCV and the resultant T-cell response.

### **Acknowledgments**

We are grateful to M.-R. Boulassel and J.-P. Routy from the Immunodeficiency Service and Division of Hematology of the Royal Victoria Hospital, J. Bruneau and staff of the Saint-Luc Hospital of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal for blood sample collection. We wish to thank D. Sauvé and D. Gagnon for helpful suggestions; S. Gimmig for assistance with flow cytometry cell sorting; M. Lainesse, S. Reis and J. Reis for technical assistance; C. Estrela for administrative assistance. We also thank Apath for the p90/HCV FL-long pU plasmid; R. Bartenschlager for providing replicons; T. Girard and N. Saba for insightful discussions and support. IGRG received a graduate research award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This work was supported by grants to RPS from the CIHR, FRSQ, CANFAR and CANVAC. MLL was supported by a CONICYT grant (No. 1050782) and startup funds granted by the Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile.

## References

Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16<sup>+</sup> monocytes. *J Exp Med*. 2003; 197:1701-7.

Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, Asaad R, Heinzl FP, Lederman MM, Lehmann PV, Valdez H. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol*. 2004; 172:4907-16.

Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*. 2001; 120:512-24.

Bjorck P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood*. 2001; 98:3520-6.

Boisvert J, He XS, Cheung R, Keeffe EB, Wright T, Greenberg HB. Quantitative analysis of hepatitis C virus in peripheral blood and liver: replication detected only in liver. *J Infect Dis*. 2001; 184:827-35.

Bronowicki JP, Loriot MA, Thiers V, Grignon Y, Zignego AL, Brechot C. Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice. *Hepatology*. 1998; 28:211-8.

Castet V, Fournier C, Soulier A, Brillet R, Coste J, Larrey D, Dhumeaux D, Maurel P, Pawlotsky JM. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol*. 2002; 76:8189-99.

Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP, Yu H, Jove R, Sotomayor EM. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*. 2003; 19:425-36.

Cleary AM, Tu W, Enright A, Giffon T, Dewaal-Malefyt R, Gutierrez K, Lewis DB. Impaired accumulation and function of memory CD4 T cells in human IL-12 receptor beta 1 deficiency. *J Immunol*. 2003; 170:597-603.

Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 1999; 10:439-49.

Craggs JK, Ball JK, Thomson BJ, Irving WL, Grabowska AM. Development of a strand-specific RT-PCR based assay to detect the replicative form of hepatitis C virus RNA. *J Virol Methods*. 2001; 94:111-20.

Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Forster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol.* 2003; 4:540-5.

Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, Patterson S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood.* 2003; 101:4505-11.

Ducoulombier D, Roque-Afonso AM, Di Liberto G, Penin F, Kara R, Richard Y, Dussaix E, Feray C. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology.* 2004; 39:817-25.

Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, Bhardwaj N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood.* 2003; 101:3520-6.

Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, Liu YJ, Lifson JD, Littman DR, Bhardwaj N. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol.* 2004; 78:5223-32.

Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science.* 2003; 300:1145-8.

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003; 19:71-82.

Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 1999; 117:933-41.

Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:9599-604.

Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2003; 187:1951-8.

Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghrayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* 2003; 302:659-62.

- Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol.* 2001; 75:5550-8.
- Harte MT, Haga IR, Maloney G, Gray P, Reading PC, Bartlett NW, Smith GL, Bowie A, O'Neill LA. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med.* 2003; 197:343-51.
- Hiasa Y, Horiike N, Akbar SM, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y, Onji M. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249:90-5.
- Ho CS, Munster D, Pyke CM, Hart DN, Lopez JA. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood.* 2002; 99:2897-904.
- Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. STAT3 regulates NF- $\kappa$ B recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood.* 2005; 105:689-696.
- Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruserud O, Gjertsen BT, Nolan GP. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell.* 2004; 118:217-28.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* 2002; 17:211-20.
- Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol.* 2001; 166:5688-94.
- Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol.* 1999; 162:5584-91.
- Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. 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; 190:1919-26.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 1999; 11:115-22.
- Keeffe EB, Iwarson S, McMahon BJ, Lindsay KL, Koff RS, Manns M, Baumgarten R, Wiese M, Fournau M, Safary A, Clemens R, Krause DS. Safety and immunogenicity of hepatitis A vaccine in patients with chronic liver disease. *Hepatology.* 1998; 27:881-6.

Kobayashi T, Walsh PT, Walsh MC, Speirs KM, Chiffolleau E, King CG, Hancock WW, Caamano JH, Hunter CA, Scott P, Turka LA, Choi Y. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity*. 2003; 19:353-63.

Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*. 1997; 277:570-4.

Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A, Kanagawa O, Unanue ER, Colonna M, Cella M. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med*. 2003; 197:899-906.

Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol*. 2003; 4:1169-76.

Lanford RE, Chavez D, Chisari FV, Sureau C. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J Virol*. 1995; 69:8079-83.

Lang R, Pauleau AL, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol*. 2003; 4:546-50.

Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol*. 1999; 162:931-8.

Larsson M, Babcock E, Grakoui A, Shoukry N, Lauer G, Rice C, Walker C, Bhardwaj N. Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *J Virol*. 2004; 78:6151-61.

Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*. 2000; 191:1499-512.

Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trepo C, Inchauspe G. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood*. 1998; 91:3841-9.

London CA, Lodge MP, Abbas AK. Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2000; 164:265-72.

Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood*. 2004; 103:1026-9.

Lore K, Betts MR, Brenchley JM, Kuruppu J, Khojasteh S, Perfetto S, Roederer M, Seder RA, Koup RA. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol*. 2003; 171:4320-8.

Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, Phillips R, Klenerman P. Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *J Immunol*. 2004; 172:1744-53.

Mellor J, Haydon G, Blair C, Livingstone W, Simmonds P. Low level or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol*. 1998; 79:705-14.

Moldvay J, Deny P, Pol S, Brechot C, Lamas E. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by in situ hybridization. *Blood*. 1994; 83:269-73.

Morsica G, Tambussi G, Sitia G, Novati R, Lazzarin A, Lopalco L, Mukenge S. Replication of hepatitis C virus in B lymphocytes (CD19+). *Blood*. 1999; 94:1138-9.

Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol*. 2004; 137:559-65.

Muratori L, Gibellini D, Lenzi M, Cataleta M, Muratori P, Morelli MC, Bianchi FB. Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*. 1996; 88:2768-74.

Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol*. 2002; 67:152-61.

Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, Jove R, Gabilovich D. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol*. 2004; 172:464-74.

O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Caminschi I, Miller JL, Anders EM, Wu L, Lahoud MH, Henri S, Scott B, Hertzog P, Tatarczuch L, Shortman K. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med*. 2002; 196:1307-19.

O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Scott B, Hertzog P, Tatarczuch L, Shortman K. Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine



homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood*. 2003; 101:1453-9.

Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology*. 1999; 29:217-22.

Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. 2003; 299:1033-6.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*. 2004; 21:733-41.

Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV, Michalak TI. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol*. 2004; 78:5867-74.

Roque Afonso AM, Jiang J, Penin F, Tareau C, Samuel D, Petit MA, Bismuth H, Dussaix E, Feray C. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol*. 1999; 73:9213-21.

Rollier C, Drexhage JA, Verstrepen BE, Verschoor EJ, Bontrop RE, Koopman G, Heeney JL. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology*. 2003; 38:851-8.

Sansonno D, De Vita S, Iacobelli AR, Cornacchiulo V, Boiocchi M, Dammacco F. Clonal analysis of intrahepatic B cells from HCV-infected patients with and without mixed cryoglobulinemia. *J Immunol*. 1998; 160:3594-601.

Sansonno D, Iacobelli AR, Cornacchiulo V, Iodice G, Dammacco F. Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Clin Exp Immunol*. 1996; 103:414-21.

Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol*. 2002; 76:5062-70.

Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribillaga L, Arina A, Melero I, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol*. 2003;77:10862-71.

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2001; 2:947-50.

Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, Verdaguer J, Santamaria P. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunity*. 2003; 19:877-89.

Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol*. 2004; 58:391-424.

Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8<sup>+</sup> T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2003; 197:1645-55.

Spörri R, Reis E Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4(+) T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*. 2005; 6:163-170.

Sung VM, Shimodaira S, Doughty AL, Picchio GR, Can H, Yen TS, Lindsay KL, Levine AM, Lai MM. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol*. 2003; 77:2134-46.

Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999; 10:39-49.

Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:15661-8.

Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2001; 194:1395-406.

Timm J, Lauer GM, Kavanagh DG, Sheridan I, Kim AY, Lucas M, Pillay T, Ouchi K, Reyor LL, Zur Wiesch JS, Gandhi RT, Chung RT, Bhardwaj N, Klenerman P, Walker BD, Allen TM. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med*. 2004; 200:1593-604.

Tsubouchi E, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol*. 2004a; 39:754-62.

Tsubouchi E, Akbar SM, Murakami H, Horiike N, Onji M. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 2004b; 137:417-23.

Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sebt S, Hamilton AD, Jove R. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem*. 2001; 276:45443-55.

Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*. 2004; 10:48-54.

Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*. 2002; 169:3447-58.

Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG, Yin Z, Kano A, Iwamoto Y, Li E, Craft JE, Bothwell AL, Fikrig E, Koni PA, Flavell RA, Fu XY. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:1879-84.

Wiedmann M, Liebert UG, Oesen U, Porst H, Wiese M, Schroeder S, Halm U, Mossner J, Berr F. Decreased immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2000; 31:230-4.

Wertheimer AM, Bakke A, Rosen HR. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology*. 2004; 40:335-45.

Yang Y, Huang CT, Huang X, Pardoll DM. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol*. 2004; 5:508-15.

Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol*. 2003; 4:551-6.

Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med*. 2002; 196:641-53.

Zehender G, Meroni L, De Maddalena C, Varchetta S, Monti G, Galli M. Detection of hepatitis C virus RNA in CD19 peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *J Infect Dis*. 1997; 176:1209-14.

## Tables and Figures

Supplemental Table 1. *Clinical and Demographic Characteristics of the Untreated HCV-infected Patients*

	n = 27
Sex (M/F)	25/2
Age <sup>†</sup>	42 ± 10.3
Category	
IDU	20 (P1-P20)
chronic	6 (P22-P27)
cirrhosis	1 (P21)
Viral load <sup>§</sup>	14 (54.7-0.2)
Genotype	
1a/b	9
3a	10
ND	8

Abbreviations: IDU, injection drug user; ND, not done.

<sup>†</sup> years shown as mean ± S.D.

<sup>§</sup> represented as median (range) x10<sup>5</sup> IU/ml

Supplemental Table 2. *Oligonucleotides Used for Real Time RT-PCR Quantifications*

### PCR primers

HCV-out5	5'-CGTCTAGCCATGGCGTTAGTA-3'
HCV-out3	5'-CGGTTGGTGTTTCTTTTGGTT-3'
HCV-in5	5'-TCTGCGGAACCGGTGAGTA-3'
HCV-in3	5'-CAAGCACCCCTATCAGGCAGTA-3'
GAPDH-out5	5'-GGTCGGAGTCAACGGATT-3'
GAPDH-out3	5'-GCCATCACGCCACAGTT-3'
GAPDH-in5	5'-TTCCATGGCACCGTCAA-3'
GAPDH-in3	5'-GTCCTTCCACGATACCAAA-3'

Strand-Tag 5'-GCTCATGGTGGCGAATAA-3'

### LightCycler probes

HCV-P1	5'-ATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGAf-3'
HCV-P2	5'-XCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCp-3'
GAPDH-P1	5'-GTCCTGGAAGATGGTGATGGGATTf-3'
GAPDH-P2	5'-XCCATTGATGACAAGCTTCCCGTTCTCp-3'

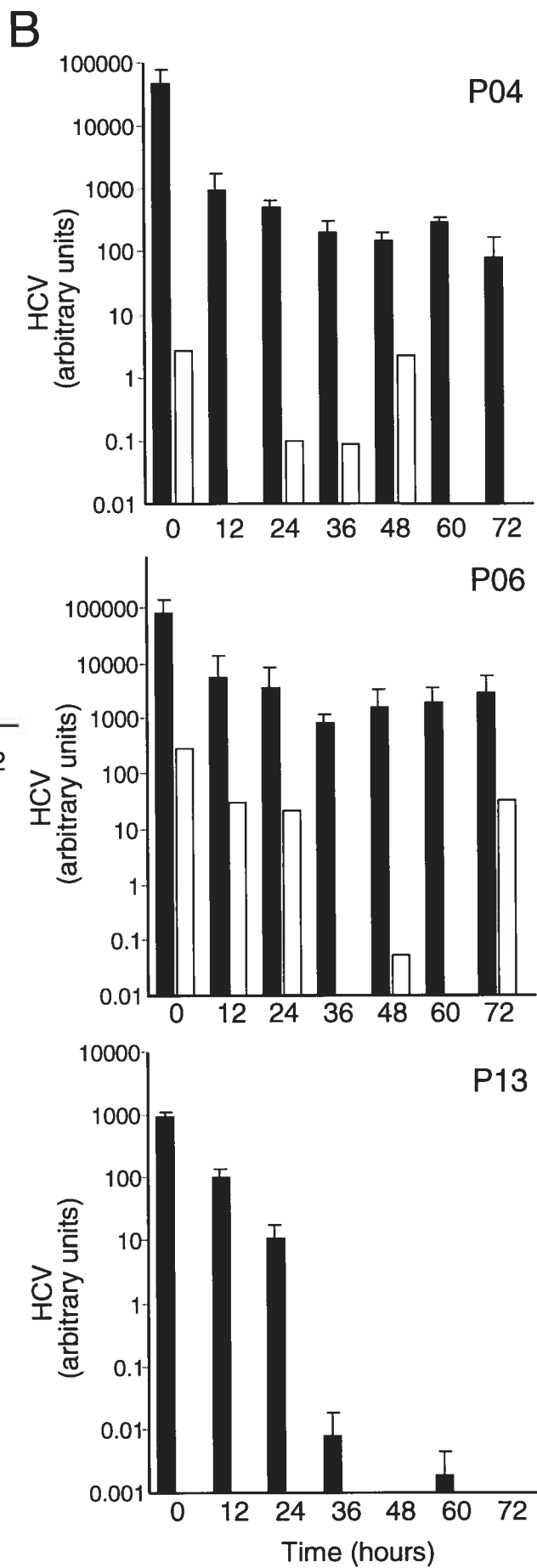
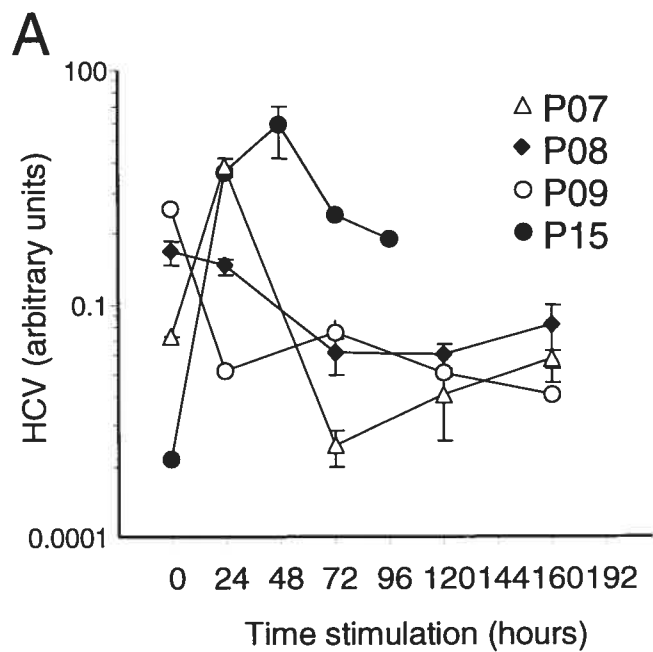


Figure 1. *Characterization of Specific HCV Reservoirs in PBMCs*

(A-B) PHA-stimulated PBMCs from HCV-infected individuals (n=7) were cultured for 1 week in the presence of IL-2, and every 12 or 48 hr, the number of strand-specific RNA molecules in cells was measured using real-time quantitative PCR with ThermoScript reverse transcriptase in duplicates for each individual time-point. Data points in (A), left, represent the positive-strand, and bars in (B), right, show the positive-strand (closed) and negative-strand (open). The results are shown as averaged values of replicates ( $\pm$  SD, indicated by error bars) of two separate measurements expressed as arbitrary units normalized to GAPDH. Patient identification numbers are indicated in graphs. The patient's genotypes were as follows: 1a/b (2), 3a (4) and unknown (1)

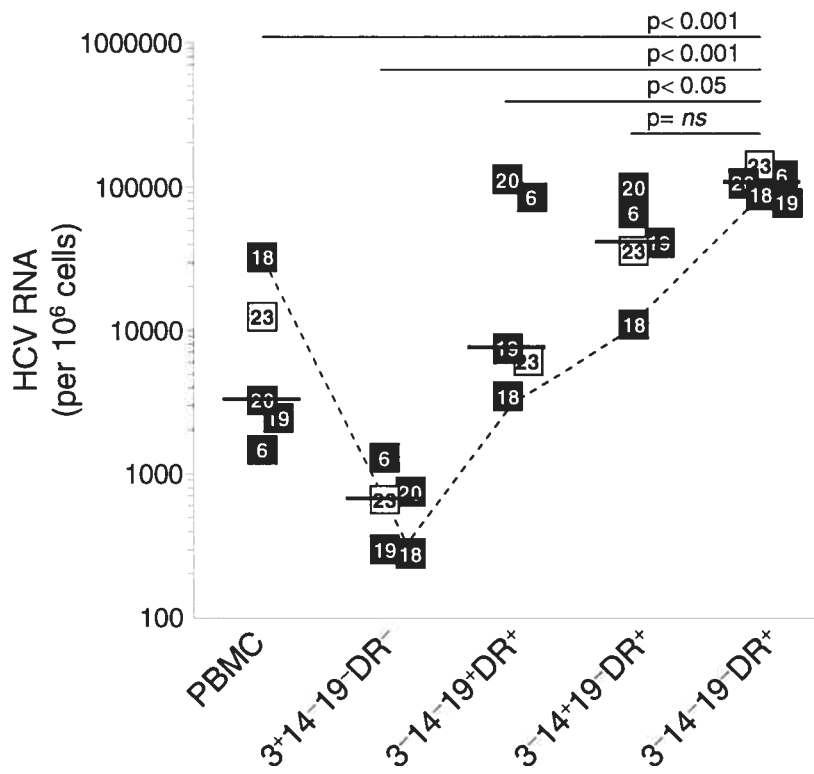


Figure 2. *Viral RNA Content in Circulating Immune Blood Cell Subpopulations*

Cellular HCV viral RNA copy numbers were quantified by real-time quantitative PCR with Omniscript reverse transcriptase in FACS-purified blood CD3<sup>+</sup> T cells, CD19<sup>+</sup> B cells, CD14<sup>+</sup> monocytes and CD3<sup>-</sup>14<sup>-</sup>19<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> dendritic cells. RNA levels were quantified in duplicates in each subpopulation for each of the five HCV-infected individuals sampled. The data are representative of one of two independent measurements. Each square indicates the detection of intracellular viral RNA from a patient with his corresponding identification number inside the square. Closed squares are injection drug users while opened squares are long-term chronically infected patients. The solid horizontal lines represent the median for each group. Statistically significant differences between groups, as calculated by Tukey's test, are shown above graph, and  $p > 0.05$  was considered not significant (*ns*). The patient's genotypes were as follows: 1a/b (2) and unknown (3).



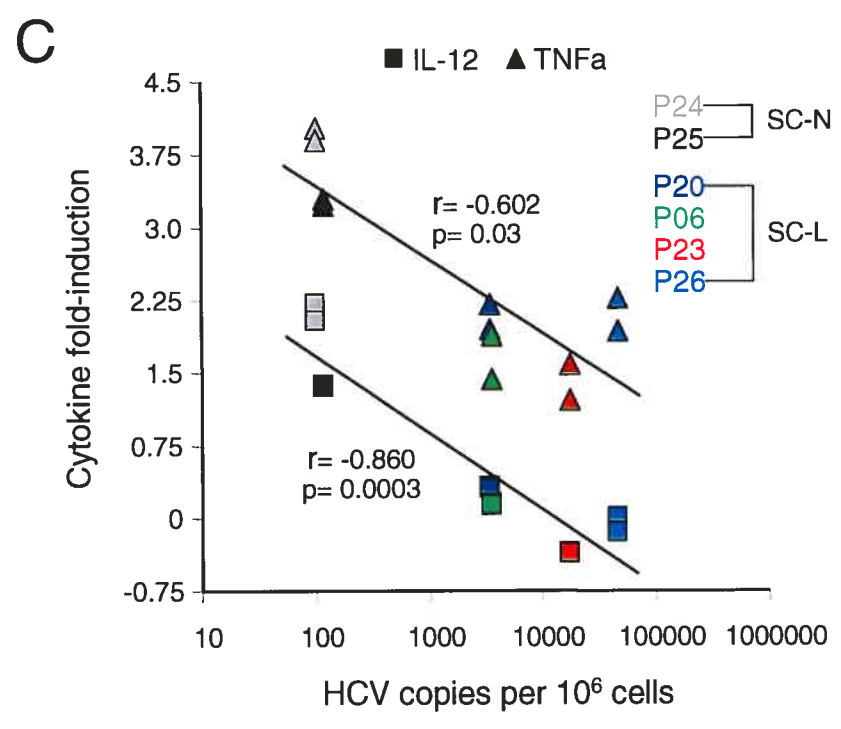
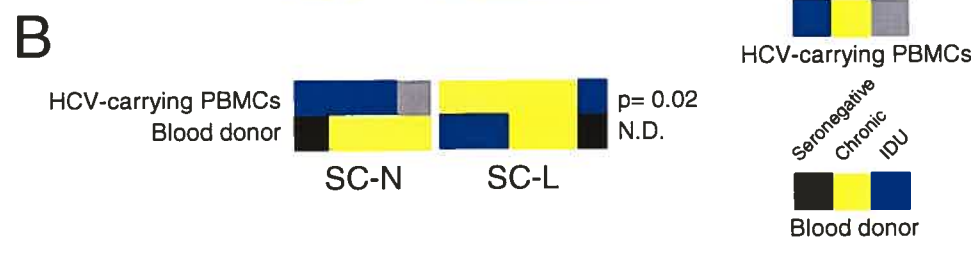
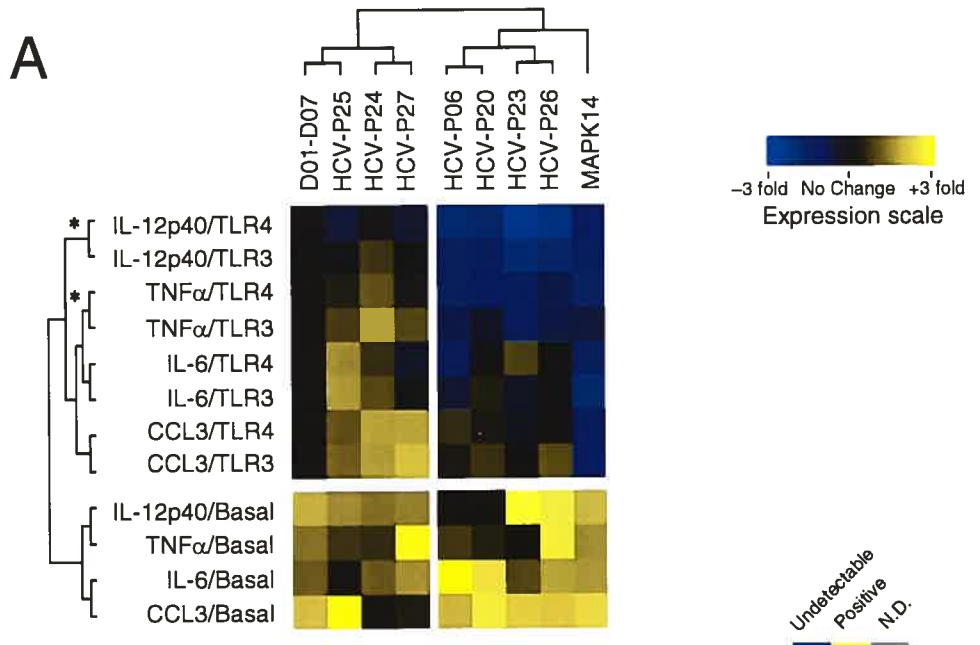


Figure 3. *Effect of Viral RNA Content on Cytokine Production in Myeloid Dendritic Cells*

After PBMCs stimulation with TRL-ligands as described in methods, analysis was performed by surface staining cells for CD14, CD33 and HLA-DR followed by fixation/permeabilization and intracellular staining for IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  and CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ). Cytokine/chemokine expression was measured in CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> blood dendritic cells to determine the effect of HCV on stimulation. A minimum of  $5 \times 10^5$  events in the live cell gate, as defined by a high side scatter, was accumulated for each sample in repeat measures.

(A) Cytokine response panel. Cytokine expression signatures of myeloid dendritic cells from seven normal blood donors (D01-D07) and seven HCV-infected patient samples were grouped according to similarity using the complete linkage hierarchical clustering algorithm in MeV software. Ratios of the fluorescent intracellular antibodies were calculated from the following equation:  $\log_2 (\text{MFI}^{\text{Stimulated}} / \text{MFI}^{\text{Basal}})$ . The panel for HCV was scaled by subtracting normal donor sample means. Basal responses are normalized relative to the minimum observed among HCV patients. Each square in the grid represents the response of one cytokine level to one condition. Fold induction is indicated by the color intensity scale (far right: yellow, high; blue, low). Stars denote significant differences between patient clusters. MAPK14 (incubated with 10  $\mu\text{M}$  of p38 kinase inhibitor SB202190) serves as a positive control for downregulation of cytokine/chemokine expression in stimulated dendritic cells.

(B) Patient characteristics and clinical markers were nonrandomly ordered by clustered signaling groups. Statistically significant association between clinical markers and biosignature-derived SCs, calculated using Fisher's exact probability test, are shown on the side of the panel.

(C-D) Cytokine fold-inductions in HCV-infected patients inversely correlated with HCV viral load per  $10^6$  PBMCs (Spearman's  $r = -0.860$ ,  $p = 0.0003$  and  $r = -0.602$ ,  $p = 0.03$  for IL-12p40 and TNF $\alpha$ , respectively). Data points (two per patient) represent the mean level of expression as a  $\log_2$  fold increase above basal detected in an individual HCV patient for TLR3 and TLR4 for two independent measurements. The patient's genotypes were as follows: 1a/b (6) and unknown (1).

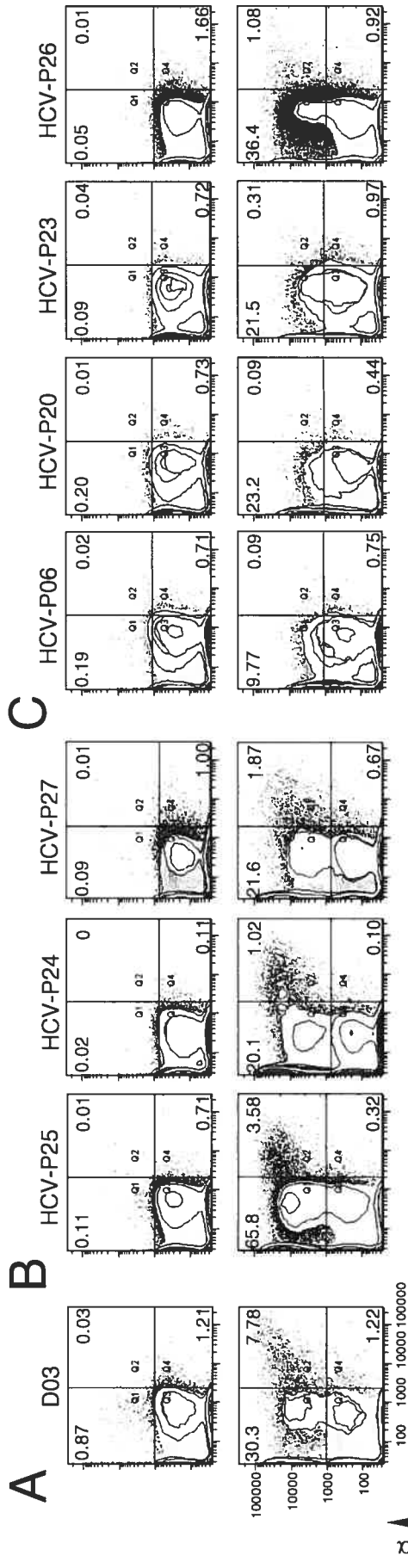


Figure 4. *Drop in Cytokine Expression is Associated with Viral Carrier Status of PBMCs*

PBMCs were cultured for 1 hr in the presence or absence of 0.1  $\mu\text{g/ml}$  of LPS before adding brefeldin A (final concentration 10  $\mu\text{g/ml}$ ) and culturing for a further 5 hr. Cells were recovered, fixed and stained for the indicated intracellular cytokines.

(A-C) Flow cytometry contour plots (gated on  $\text{CD14}^-33^+\text{HLA-DR}^+$ , in black) of TNF- $\alpha$  and IL-12p40 (y and x axis, respectively) expression following LPS stimulation in a representative healthy donor [A] and HCV-infected patient samples from SC-N [B] and SC-L [C]. Both the basal unstimulated levels (top) and response to LPS (bottom) are shown. Similar data was obtained for poly I:C (not shown). Numbers inside plots indicate percentages of each population in quadrants.

(D-E) Combined  $\log_2$  ( $\text{MFI}^{\text{Stimulated}}/\text{MFI}^{\text{Basal}}$ ) data for TLR3 and 4-ligand stimulated response node states of HCV-infected patients carrying HCV within their PBMCs (SC-L) or not (SC-N) are shown for the samples assayed. Each circle represents the level of expression as a  $\log_2$  fold increase above basal detected in an individual HCV patient for TLR3 and TLR4 (two data points per patient). Data concerning the healthy donor response are shown as control. The solid horizontal lines represent the average for each group. Statistically significant differences between the groups, calculated by post-ANOVA Tukey's test and Student's t test, are shown above and presented in the text respectively.

The patient's genotypes were as follows: 1a/b (6) and unknown (1).

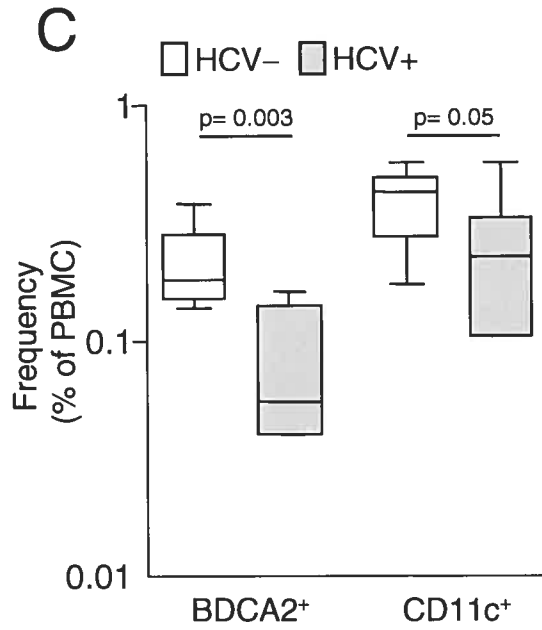
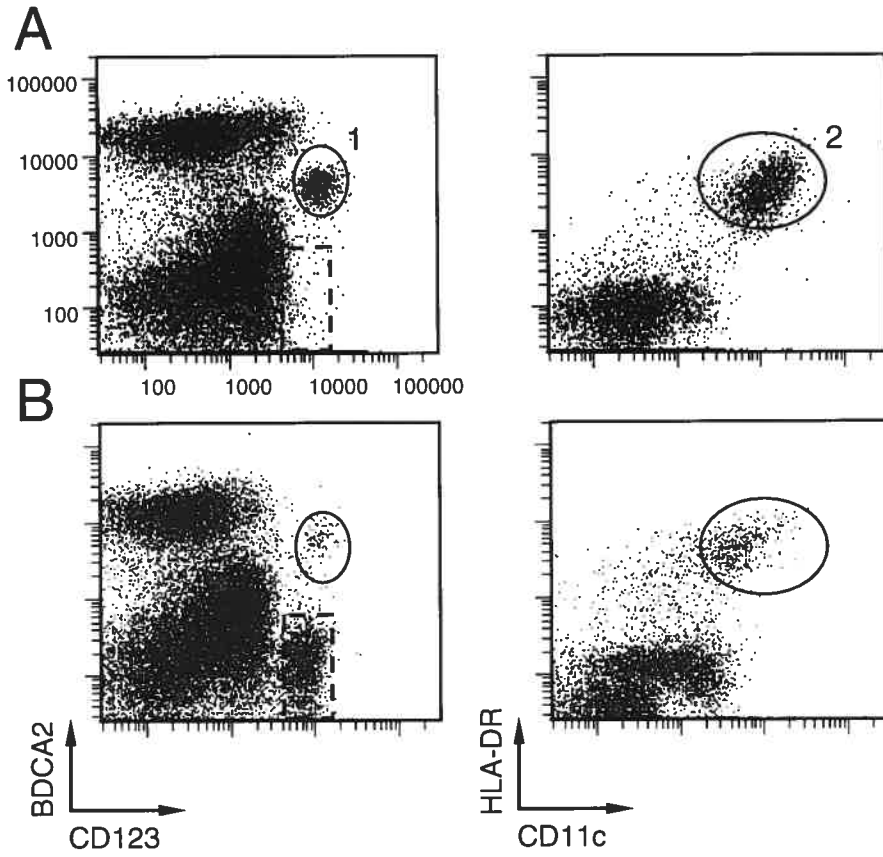
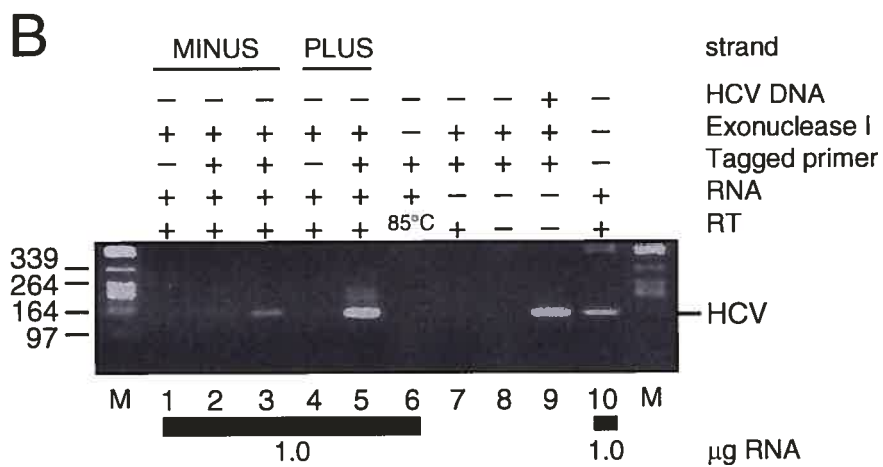
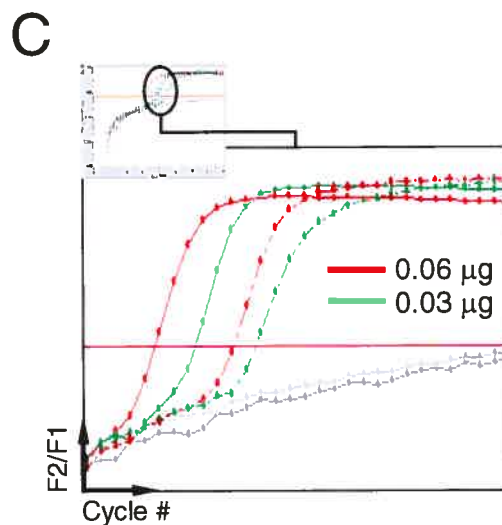
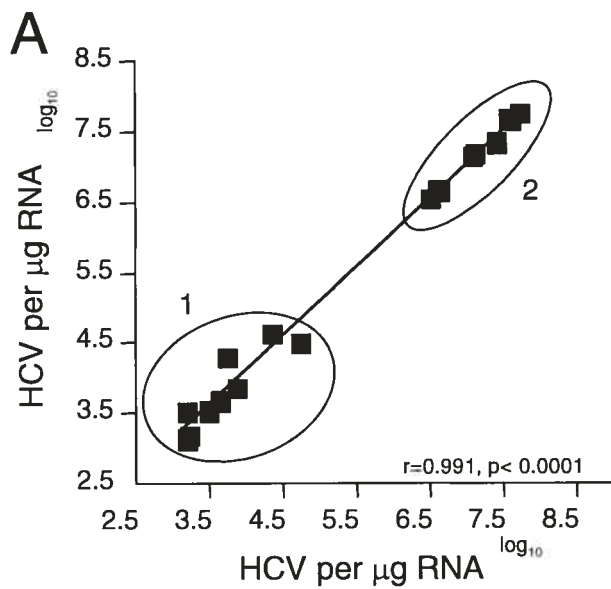


Figure 5. *Influence of HCV on Peripheral Blood Dendritic Cell Frequencies*

Freshly isolated uncultured PBMCs were surface stained in duplicates for 8-color multiparameter flow cytometry with FITC-conjugated anti-CD16/BDCA2, PE-Cy5.5-conjugated anti-CD123, ECD-conjugated anti-CD62L, APC-conjugated anti-CD11c, APCCy7-conjugated anti-CD4, biotinylated anti-HLA-DR followed by Cascade Yellow-streptavidin and lineage specific antibodies against CD3 (PE-Cy7), CD14 (PE), and CD19 (PE-Cy7).

(A-B) Flow cytometry dot plots representative of circulating frequencies of CD3<sup>-</sup>19<sup>-</sup> gated plasmacytoid (left) and myeloid (right) dendritic cells are shown for healthy volunteers (D06, [A]) and HCV-infected patients (P20, [B]). Gate 1 corresponds to BDCA2<sup>+</sup>CD123<sup>bright</sup>4<sup>hi</sup>11c<sup>-</sup>14<sup>-</sup>62L<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> plasmacytoid and gate 2 corresponds to CD11c<sup>+</sup>14<sup>-</sup>16<sup>-</sup>4<sup>+</sup>123<sup>dim</sup>62L<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> myeloid dendritic cells. CD123<sup>+</sup>BDCA2<sup>-</sup> cells, which correspond to granulocytes, did not stain for HLA-DR (striated box gate).

(C) Box plot representation of circulating frequencies of blood BDCA2<sup>+</sup> plasmacytoid precursor and CD11c<sup>+</sup> myeloid dendritic cells in HCV-infected individuals (closed) and healthy age-matched controls (open) measured as percentage of total PBMC (n=7 per group). The horizontal lines represent from top to bottom the maximum, 75<sup>th</sup> percentile, median, 25<sup>th</sup> percentile, and minimum. Statistically significant differences between the two groups were calculated by two-tailed Student's t-test, and are shown above the graph. The patient's genotypes were as follows: 1a/b (4) and unknown (3).



Supplemental Figure S1. *Accurate Strand-specific Quantification of HCV RNA with real-time PCR*

Existing tagged strand-specific RT-PCR protocols for HCV were adapted for limited-cycle nested RT-PCR in the LightCycler instrument (Craggs et al., 2001). Reverse transcription was carried out at 55-60°C for 20-30 minutes in a one-tube two-step RT-PCR reaction with Thermoscript reverse transcriptase and HCV-tagged strand-specific primers (see Supplemental Table 2). The reverse transcriptase was inactivated by heating for 5 minutes at 85°C, cDNA samples were incubated with RNase H and exonuclease I at 37°C for 30 min and PCR conditions were as described in methods. As a routine reaction control for the strand-specific signal, the RT step was carried out without a HCV-tagged primer.

(A) HCV RNA levels were measured in duplicate in a group of 16 samples ([1] 9 from PBMCs isolated from HCV-infected subjects and [2] 7 from independent experiments carried out on the same source of I<sub>377</sub>neo/NS3-3'/wt HCV clone 9-13 replicon RNA). The correlation between the two estimates (Spearman's  $r=0.991$ ,  $p<0.0001$ ), combined with the fact that the regression curve is close to the diagonal, demonstrates the reproducibility of this quantification assay.

(B) Equal amounts of RT-PCR samples from 9.13 replicons were resolved on a 2% agarose gel. Product bands were visualized by staining with ethidium bromide. No specific PCR band was detected in the absence of primer during cDNA synthesis (lanes 1 and 4) or after reverse transcriptase had been heat inactivated (5 min at 85°C) prior to cDNA synthesis, indicating that the HCV strand-specific signal observed in lanes 2, 3 and 5 was due to authentic priming of viral strands. The RT-PCR product corresponding to HCV genomic RNA is indicated. Exonuclease I was used to eliminate unincorporated tagged RT primer from the cDNA reaction prior to PCR amplification. Only when exonuclease I treatment was withheld (lane 10) did false-positive PCR signals appear, indicating that these conditions greatly reduce false-priming.

(C) Real-time PCR amplification curves of positive (solid) and negative (dashed) strand HCV RNAs plotted by LightCycler software v3.0 as a function of cycle numbers. Gray lines, which are below the threshold noise-level (horizontal red line), correspond to plots for cDNA controls synthesized in absence of tagged primer in order to monitor for incorrect strand amplification. The lack of fluorescence emission in these controls clearly demonstrates that under the described real-time conditions, false-priming of the incorrect strand due to secondary structure self-mediated priming or random priming by cellular nucleic acids does not occur.



**CHAPITRE III**

**DISCUSSION ET CONCLUSION**

## 1. Discussion

L'infection qui est attribuable à l'agent étiologique de l'hépatite C évolue vers une virémie persistante qui entraîne des maladies du foie. La réplication continue du VHC en présence de CTL CD8<sup>+</sup> et d'anticorps spécifiques à des antigènes viraux, alors que la réponse CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 (IL-2<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>) est indétectable, tend à démontrer que les CTL, seuls avec la réponse humorale, sont incapables d'enrayer l'infection dans la majorité des cas. En effet, la recrudescence de la virémie est positivement corrélée à la perte des effecteurs CD4<sup>+</sup> VHC-spécifiques (100,111). Plusieurs travaux récents ont montré que les dendritiques présentant des voies de signalisation compétentes via les *Toll-like receptors* (TLR) sont les initiateurs qui fournissent toutes les interactions co-stimulatoires nécessaires au bon contrôle du sort des cellules T naïves lors de leur activation et la génération d'une mémoire immunitaire fonctionnelle (176,270,271,317). Étant donné la désensibilisation de la réceptivité des TLR des dendritiques dans le cadre de l'infection VHC (6,170) et sa restauration suivant le début de la thérapie antivirale (360), il est plausible de croire que les dendritiques sont activement ciblées par le VHC qui persiste chez l'hôte.

Les données *in vivo* justifiant cette position sont rares. De fait, le rôle physiologique de ces cellules dans l'infection a été surtout inféré par l'étude de cohortes hétérogènes avec des systèmes de dérivation *in vitro* des dendritiques. Conséquemment, organiser les conclusions de tous les rapports récents en une hypothèse unificatrice expliquant le sort et la fonction des dendritiques dans le cadre de l'infection au VHC est difficile puisque ce champ d'étude n'a produit à date que des résultats contradictoires. En effet, plusieurs groupes ont suggéré que les fonctions de présentation d'antigène des dendritiques ne sont pas compromises et que les défauts observés sont plutôt une conséquence passive de pathologies secondaires émanant d'une virémie plasmatique élevée (198,220,295). Néanmoins, la présence d'ARN génomiques et antigénomiques a été détectée parmi les dendritiques isolées de patients chroniquement infectés (15,107,243,258,359). Toutefois, le rôle que ce virus cantonné dans les dendritiques joue dans la désensibilisation de leurs TLR (6) et le degré de restauration dans les cellules ne contenant pas de virus ne sont toujours pas élucidés. Aussi, une meilleure

compréhension de l'impact qu'a l'existence d'un réservoir d'origine dendritique sur le nombre et les capacités fonctionnelles de ces cellules présente un intérêt certain pour expliquer comment ces CPA peuvent être impliquées dans la perte des corrélats de la protection immunitaire.

La discussion qui suit se concentre sur les résultats obtenus en lien avec la caractérisation d'un réservoir d'importance immunologique qui se constitue dans les cellules dendritiques périphériques chez des patients virémiques sans antécédents récents de thérapie antivirale (n=10 naïfs, n=3 non-répondant). L'équipe de Onji (360) a montré que la circulation de dendritiques infectées (contenant de l'ARN génomique) paraît très affectée sous ribavirine-INF- $\alpha$ 2, même lorsque la virémie ne diminue que peu. Toutefois, la notion que la topologie des réservoirs est inchangée après traitement antiviral repose en partie sur l'hypothèse que la production virale n'est pas totalement inhibée par les antirétroviraux ce qui permet l'infection de nouvelles cellules. Le profil habituel de la courbe effet-dose d'un antiviral est peu compatible avec une inhibition à 100%. La multiplication résiduelle du virus ne peut donc être négligée. L'action des régimes antiviraux à base de ribavirine-INF- $\alpha$ 2 aboutit plutôt à un nouvel état pseudo-stationnaire dans lequel la multiplication virale est diminuée de plusieurs ordres de grandeur, par exemple d'un facteur  $10^4$ , ce qui est considérable. Cet état d'équilibre dynamique peut évoluer dans deux directions opposées: d'un côté, le contrôle total de la réplication virale par extinction progressive des microfoyers de multiplication virale, de l'autre, un nouvel état pseudo-stationnaire à charge virale plus élevée si un virus résistant émerge lorsque le traitement perd de son efficacité (cas d'échec non-répondant). C'est manifestement ce type d'événement que l'on observe dans la grande majorité de cas VHC-infectés, avec la recrudescence de la charge virale plasmatique et du nombre de cellules immunitaires infectés, alors que ces deux paramètres étaient indétectables sous traitement. Les données les plus récentes viennent confirmer qu'il existe bien des microfoyers de multiplication virale résiduelle après traitement, alors même que la virémie plasmatique n'est plus détectable depuis plusieurs mois (275,282,283). En effet, dans certains cas exceptionnels, par exemple chez des sujets convalescents à

long terme après traitement (répondant), la virémie plasmatique peut être très diminuée, en deçà des seuils de détection actuels, alors que la circulation de dendritiques infectées reste paradoxalement détectable (276). Les outils développés dans cette étude vont permettre une quantification et une caractérisation plus précises du devenir des dendritiques infectées chez des sujets convalescents ou n'ayant pas répondu au traitement ribavirine-INF- $\alpha$ 2.

Pour corréler la présence du virus avec les défauts dans la fonction des dendritiques, nous avons commencé avec la démonstration préalable que les cellules mononuclées du sang contiennent des sous-ensembles qui peuvent agir en tant que réservoir extrahépatique dans lesquelles le virus reste cantonné. Nous avons établi, en utilisant une méthode quantitative de détection de la région 5' conservée du génome viral par PCR en temps réel, que 84.6% de la totalité des échantillons analysés (n=13) contenaient des niveaux variables d'ARN génomiques du VHC. Pour montrer qu'il était vraiment question d'une permissivité des cellules immunitaires, les ARN extraits de PBMC CD14<sup>-</sup> stimulés avec 3  $\mu$ g/ml de PHA et 200 U/ml d'IL-2 ont été récoltés à intervalle régulier sur une période de sept jours et analysés pour estimer l'accumulation de l'ARN des deux brins viraux. La persistance à court terme des ARN génomiques du VHC dans les PBMC stimulés coïncide avec la présence de transcrits viraux de polarité négative (Fig.1). Ceci serait en contradiction avec un effet de dilution cumulatif à mesure que la population cellulaire augmente par division, s'il n'y avait une faible réplication du génome pour compenser ce phénomène. Ces observations sont en accord avec des données similaires publiées pour des hépatocytes primaires, des lymphocytes B et des PBMC (34,38,251,307,345). Ces résultats, ainsi que la localisation cytoplasmique de l'antigène viral Core par immunofluorescence avec l'anticorps polyclonal RR8 (M.L.L., manuscrit en préparation), indiquent une origine intracellulaire pour l'ARN viral amplifié et montrent clairement que les réservoirs hématopoïétiques existent d'une manière indépendante des interactions non-spécifiques (i.e. FcR, phagocytose) soupçonnées d'être à l'origine du signal détecté.

Nos observations confirment qu'il y a une relation distincte entre le VHC et les cellules hématopoïétiques tel que précédemment suggéré par des études de compartimentalisation et d'hybridation *in situ* (69,250,255,261,297,308). Par conséquent, nous avons pu utiliser la détection quantitative d'ARN génomique du VHC comme marqueur fiable d'une interaction spécifique entre le virus et les cellules immunitaires de sujets infectés dans les expériences visant à valider le concept d'un réservoir viral au sein des dendritiques qui perturbe la cascade de signalisation transduite via les TLR.

Afin de déterminer si les dendritiques sont ciblées par le VHC, des populations de dendritiques sanguines pures ( $\geq 98\%$ ) ont été isolées à partir de PBMC de patients virémiques mis en culture pour moins de 16 h, trié par cytométrie en tant que compartiment cellulaire CMH-II<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>14<sup>-</sup>19<sup>-</sup> et analysé par RT-PCR pour la quantification d'ARN viral. La détection *ex vivo* d'ARN du VHC dans les dendritiques périphériques (n=5) est conforme aux observations montrant que ce compartiment cellulaire contient sans ambiguïté le virus *in vivo* (107,243,359). Notamment, la masse de l'ARN détectée est distribuée dans le compartiment des cellules dendritiques en comparaison avec les niveaux détectés dans les échantillons de lymphocytes B tel que défini par l'expression de CD19 (5.03 et 4.0 log<sub>10</sub> copies d'ARN par 10<sup>6</sup> cellules respectivement; p<0.05), en nette opposition avec une série d'observations faites par des études antérieures (30,392). Les travaux de Sung et al. (345) ont déjà montré que les lymphocytes B (CD3<sup>-</sup>14<sup>-</sup>19<sup>+</sup>CMH-II<sup>+</sup>) sont susceptibles de soutenir transitoirement une infection HCV répliquative *in vitro*. Ainsi, la présence des plus hauts niveaux d'ARN du VHC seulement dans les dendritiques périphériques relativement à ceux quantifiés dans les échantillons originaux de PBMC (p<0.001), souligne leur rôle en tant que l'un des sites réservoir préférentiel du virus dans la périphérie sanguine. Toutefois, le mécanisme par lequel le génome du VHC persiste *in vivo* sous la forme d'un réservoir au sein des dendritiques n'est pas connu. Une hypothèse envisageable est que les progéniteurs hématopoïétiques des dendritiques myéloïdes pourraient être infectés par le VHC et, par la suite, transmettre l'infection à leur progénie. Ainsi, Sansonno *et al.* (306) ont montré par

RT-PCR in situ et cytométrie (détection de protéines virales) que les CD34<sup>+</sup> isolés de la moëlle osseuse ou de la périphérie sanguine de sujets VHC-infectés sont porteurs du virus *in vivo* tout en étant le siège d'une réplication virale importante capable de soutenir *ex vivo* le déroulement du cycle viral complet. Dans ce contexte, le renouvellement des dendritiques myéloïdes circulantes infectées en périphérie à partir de la différenciation des précurseurs hématopoïétiques pourrait favoriser le maintien du réservoir observé à long terme. Par ailleurs, une toute autre hypothèse peut être émise dans laquelle l'expansion homéostatique par LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 (161) des dendritiques infectées activeraient les conditions optimales pour une réplication virale *in vivo* et la transmission aux cellules filles. En somme, le réservoir dans les dendritiques est peut-être un site de persistance prolongée du VHC sous forme infectieuse ou, avant tout, une cible cellulaire dans laquelle persiste un niveau détectable de la transcription des ARN viraux qui signent des événements récents de réplication ce qui favorise son maintien.

Les TLR sont des *Pathogen Recognition Receptors* (PRR) transmembranaires pour lesquels le domaine extracellulaire est composé de motifs répétés riches en leucine qui reconnaissent sélectivement divers PAMP (153). Ces PRR jouent un rôle central dans la reconnaissance des pathogènes et l'initiation subséquente des réponses immunitaires contre ceux-ci. Ainsi, le TLR4 (membranaire) détecte l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des bactéries GRAM négatives et le TLR3, de localisation endosomale, reconnaît les ARN bicaténaires produits lors d'événements de réplication d'un génome viral dans une cellule infectée (347). L'engagement de ces deux TLR conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF3 (voie TRIF-dépendante) permettant la production des cytokines pro-inflammatoires et des IFN de type 1 (IFN- $\alpha/\beta$ ) qui sont nécessaires à l'initiation de la réponse acquise (voir Figure 7). MyD88 est recruté au niveau du domaine cytosolique TIR du TLR4 et active une cascade de phosphorylation impliquant les kinases IRAK-1/4 qui amplifient le message en s'associant à la E3 ligase TRAF6, menant à l'activation de TAK1 et du complexe NEMO (IKK $\gamma$ )-IKK $\alpha/\beta$  (4,348). La finalité de la voie MyD88-dépendante est que I $\kappa$ B $\alpha$  soit phosphorylé à la Ser<sup>32</sup> pour induire sa dégradation par

le protéasome, ce qui permet la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et la transcription de gènes pro-inflammatoires telles l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le TNF $\alpha$ , le CCL5 et le CCL3 (348). Bien que la voie TRIF-dépendante (partagée par le TLR3 et le TLR4) soit spécialisée dans l'expression d'IFN- $\beta$  par la dimérisation du facteur transcriptionnel IRF3 suite à sa phosphorylation par les kinases TBK1/IKK $\epsilon$ , le TLR3 peut néanmoins activer NF- $\kappa$ B par une voie IRAK-indépendante qui fait appel à TRIF et le complexe TRAF6-TAB1/2-TAK1 (158).

L'invalidation des adaptateurs spécifiques au TLR (Figure 7, encadrés) conduit à des anomalies de fonctionnement du système immunitaire inné chez la souris. L'observation que les dendritiques MyD88<sup>-/-</sup> (270,335), TRAF6<sup>-/-</sup> (176), TRAM<sup>-/-</sup> (383) et TRIF<sup>-/-</sup> (137,384) sont défectueuses *in vivo* dans leur capacité à sécréter des cytokines (IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ) et à stimuler une réponse T antigène-spécifique, alors que l'expression des molécules de costimulation est inchangée, suggère l'incapacité que ces cellules ont à potentialiser la prolifération de cellules T antigène-spécifiques en l'absence d'une signalisation médiée par les TLR. Puisque la signalisation via ces TLR paraît donc centrale à l'induction des cytokines inflammatoires et à la génération de réponses T compétentes, plusieurs stratégies virales de rétrocontrôle négatif ont pu être mises en œuvre pour éviter l'effet de la reconnaissance d'un PAMP viral par la famille des TLR. Plusieurs moyens d'inhibition du TLR3 ont été décrits récemment pour le VHC. L'un d'eux fait intervenir le ciblage protéolytique de l'adaptateur TRIF en Cys<sup>372</sup> par l'activité protéase de la NS3/4A (89,200). Un autre moyen fait intervenir la région hélicase (514-1893 aa) de la NS3 qui entre en compétition directe avec IRF3 pour sa liaison à la kinase TBK1, empêchant ainsi la dimérisation et la phosphorylation d'IRF3 par cette dernière (266). Il semblerait alors que l'un des rôles physiologiques de la protéase NS3/4a dans des cellules infectées soit de prévenir l'induction d'IFN- $\beta$  suite à la phosphorylation et l'activation d'IRF3 par la voie TRIF-dépendante du TLR3 (33).

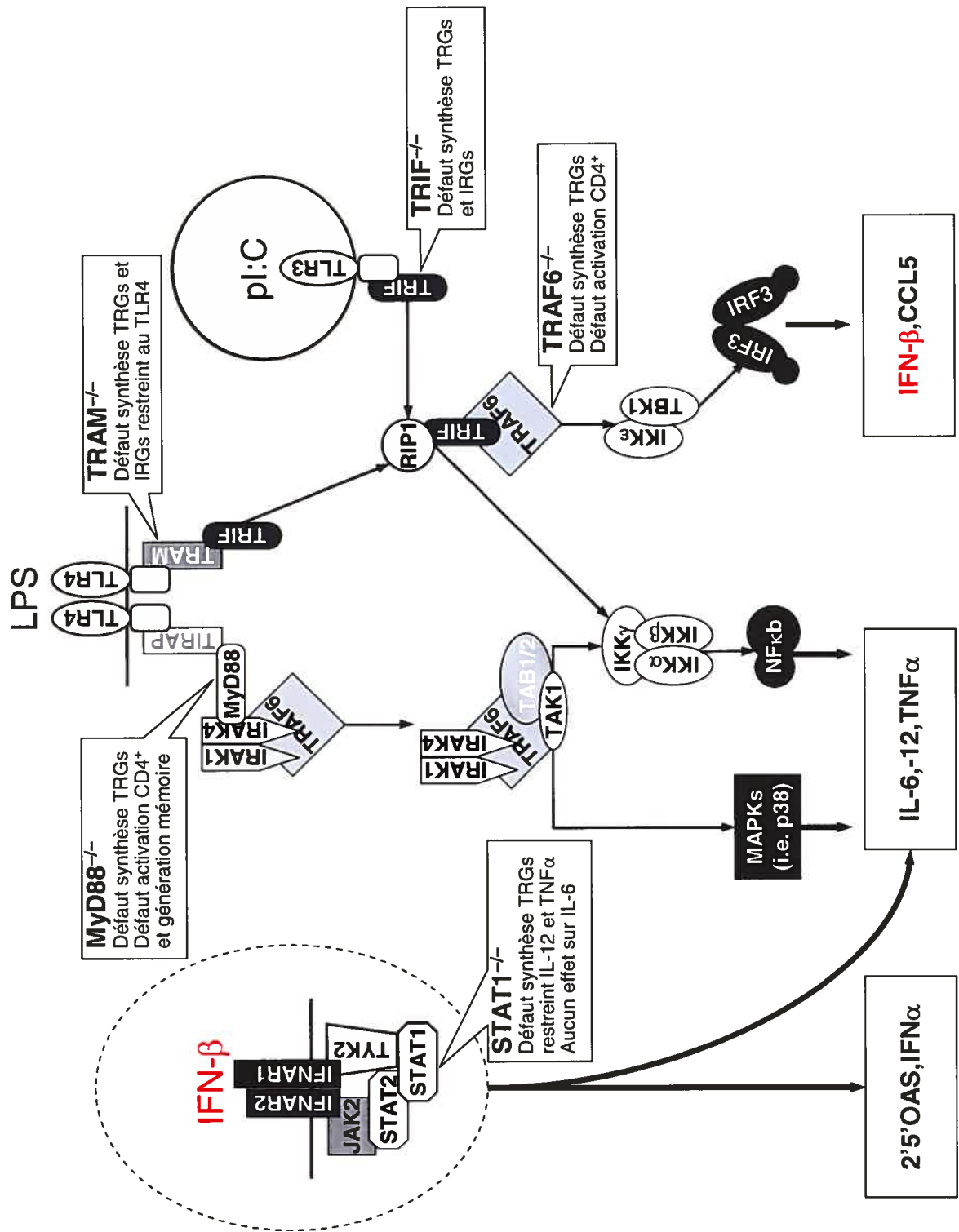




Figure 7. *Voies de signalisation des TLR3 et 4*

Ces cascades d'évènements signalitiques aboutissent à l'activation des facteurs transcriptionnels NF- $\kappa$ B et IRF3 qui permettent la transcription des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-12 et TNF $\alpha$ ) et de l'IFN- $\beta$  respectivement. Voir le texte pour plus de détails.

Conséquemment, nous avons tenté de déterminer si l'ARN du VHC détecté exerçait une influence sur la transduction des signaux provenant des récepteurs TLR3 (poly I:C) et TLR4 (LPS) par analyse cytométrique des profils d'expression de multiples cytokines et chémokines (IL-6, IL-12, TNF $\alpha$  et CCL3) produites par les cellules dendritiques myéloïdes (CD14<sup>-</sup>33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) du sang. Pour ce faire, des échantillons provenant de sept sujets séroconvertis ont été analysés en parallèle par cytométrie intracellulaire à six couleurs et quantifiés pour leur contenu en ARN viral afin d'établir que la désensibilisation des TLR est restreinte aux patients virémiques donnant un signal positif en RT-PCR, correspondant donc à la présence d'ARN viral dans les PBMC. Les niveaux d'expression d'IL-12 et de TNF $\alpha$ , suivant l'engagement des deux TLR analysés, corrèlent significativement avec la détectabilité d'ARN viral dans les PBMC ( $p=0.02$ ), et tous les cas séropositifs contenant de l'ARN viral dans les PBMC ( $n=4$ ) avaient des niveaux plus bas comparativement à ceux n'ayant aucune trace discernable d'ARN du VHC ( $n=3$ ) (Figures 3 et 4). Les profils d'expression *ex vivo* obtenus par cytométrie pour l'IL-12 sont conformes à d'autres observations montrant que les dendritiques myéloïdes circulantes ont des réductions importantes de leur capacité à synthétiser cette cytokine dans le contexte de l'infection au VHC après engagement du TLR3 (6). Par ailleurs, les niveaux d'expression en IL-6 et CCL3 pour les deux sous-groupes cliniques VHC<sup>+</sup> détectés étaient similaires à ceux observés pour les donneurs sains (Figure 3a). Ces résultats démontrent que l'expression de certaines cytokines (IL-12 et TNF $\alpha$ ) est intimement liée à la capacité de détecter l'ARN viral dans les leucocytes en circulation. En particulier, il y a un lien entre la réceptivité des dendritiques myéloïdes à cette série de stimuli de TLR et la détection du génome viral, suggérant que certains éléments viraux interdisent sélectivement aux signaux de danger d'être convenablement transmis par les TLR.

Aussi, dans les individus infectés, l'expression conjointe d'IL-12 et de TNF $\alpha$  est inversement proportionnelle aux niveaux de molécules d'ARN du VHC détectés ( $r=-0.860$ ,  $p=0.0003$  et  $r=-0.620$ ,  $p=0.03$ , respectivement; Figure 3), suggérant que cette désensibilisation de la signalisation dose-dépendante des TLR pourrait être causée par l'expression de protéines du virus exprimées dans les dendritiques hôtes.

Par exemple, A52R, une protéine produite lors du cycle de réplication du virus vaccinia, est reconnue pour inhiber la transduction du signal originant de la reconnaissance des PAMP par leurs TLR le long de l'axe IRAK-TRAF6-IKK (127). De plus, l'activation de NF- $\kappa$ B tel que médiée par la cascade de signalisation dérivant du TLR3 est inhibée dans des cellules HEK-293T exprimant transitoirement la forme pleine-longueur (1-191) ou mature (1-173) de la Core du VHC (I.G.R.G, G.B. et D.L., données non publiées), venant conforter l'idée que certaines protéines du VHC ont un effet inhibiteur puissant sur la signalisation des TLR (91,309).

Yoshida *et al.* (389) et ses collègues ont récemment mis en évidence que la Core du VHC mène directement à l'activation de STAT3 en interagissant réciproquement avec la région linker aux résidus 465-585 de STAT3, ce qui permet la phosphorylation en Tyr<sup>705</sup> catalysée par une voie JAK-indépendante. L'expression d'un dominant actif de STAT3 dans des dendritiques inhibe à la fois le recrutement de NF- $\kappa$ B à ses sites de liaison au sein du promoteur de l'IL-12 $\beta$  ainsi que la transcription du gène (138). De plus, des cellules dendritiques isolées de souris déficientes pour le gène *Socs3* ou porteuses d'une protéine SOCS3 mutée pour le site de liaison de la gp130 (Y759F) montrent une forme STAT3 hyperactivée (51,193), une inhibition de la production de TNF $\alpha$  après stimulation via le TLR4 (388) et sont inefficaces dans leur capacité à activer des cellules T comparativement à des cellules dendritiques provenant de souris sauvages (184). Ainsi, les caractéristiques fonctionnelles partagées entre des souris SOCS3<sup>-/-</sup> et les cellules dendritiques contenant de l'ARN du VHC suggèrent la possibilité intéressante que STAT3 représente l'intermédiaire moléculaire reliant la désensibilisation des TLR au VHC dans ces dernières. Conséquemment, il s'avère important d'établir si STAT3 est impliqué dans le développement des défauts observés par cette étude puisque la décision entre l'activation d'une réponse immunitaire versus sa tolérogénisation paraît compter sur le statut actif de STAT3 dans ces CPA, la tolérance étant renversée quand STAT3 est bloqué (349,368,374).

Les signaux originant de la reconnaissance des IFN de type 1 ( $\alpha/\beta$ ) sont sélectivement exigés pour la maturation des dendritiques après l'engagement du TLR3 par du polyI:C ou une infection virale répliquative. En effet, les dendritiques issues de souris IFNAR1<sup>-/-</sup> sont altérées dans leur capacité à induire la transcription des gènes TNF $\alpha$  et IL-12p40 après une infection avec le virus NDV, pendant que leurs capacités à migrer vers les organes lymphoïdes ne sont aucunement affectés, l'expression de CCR7 étant comparable à celle des souris sauvages (140). Gautier *et al.* (96) ont montré que les dendritiques de souris IFNAR<sup>-/-</sup>, STAT1<sup>-/-</sup> et de type sauvage produisaient des quantités similaires d'IL-6 après stimulation par le TLR3, 4 et 7/8. Contrairement à l'IL-6, la synthèse d'IL-12 et de TNF $\alpha$  est diminuée dans des souris STAT1<sup>-/-</sup> (167). Ceci suggère que cet engagement des TLR sur les dendritiques mène à l'expression endogène d'IFN de type 1 qui, une fois sécrété, synergise avec NF- $\kappa$ B pour obtenir la production optimale de certaines cytokines. STAT1 est une composante signalitique essentielle à la cascade découlant du IFNAR (336) (Figure 7). Quelques travaux récents dans des modèles hépatiques ont montré que les protéines du VHC (i.e. Core, NS3/4A) réduisaient l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 (29) en incitant sa dégradation par le protéasome (214). De toute évidence, ceci pourrait expliquer la dichotomie en terme de réponse des cytokines observée dans les dendritiques infectées. Toutefois, la détection d'antigènes viraux au sein même des dendritiques présentant les défauts de signalisation décrits par cette étude est indispensable pour confirmer l'implication d'une perte de l'activité STAT1 dans l'inhibition sélective des cytokines IL-12 et TNF $\alpha$ .

Tenant compte des conclusions tirées des travaux de Park *et al.* (269), qui montrent que le transfert adoptif d'effecteurs CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 *L. major*-spécifique dans des souris IL-12p40<sup>-/-</sup> contrairement à RAG1<sup>-/-</sup> ne confère pas de protection de type rappel, il est envisageable de considérer que l'IL-12 (et/ou l'IL-23) est nécessaire dans le maintien *in vivo* d'une mémoire T<sub>EM</sub> à long terme (156,341). L'observation d'une corrélation positive entre l'IL-12 produit par le TLR3 et la fréquence d'effecteurs CD4<sup>+</sup> VHC-spécifiques chez des sujets virémiques (63) est en accord avec cette idée. Plusieurs explications peuvent être proposées quant aux causes expliquant ces observations. Ce

peut être que ces cytokines agissent comme facteur de survie soutenant l'expansion de cellules  $CD4^+45RA^- CCR7^+ IL-2^+IFN-\gamma^{+/-}$  nouvellement activées (253) puisqu'il a été montré qu'elles peuvent réguler à la hausse l'expression de la sous-unité  $\alpha$  de l'IL-2R (145), réguler l'activité de  $p27^{Kip}$  (394) ou retarder l'apoptose Fas-dépendante (237) à laquelle les populations  $T_H1$  sont très susceptibles (393,379). Mais cet épuisement des effecteurs  $CD4^+IFN-\gamma^+$  ne peut expliquer à lui seul, et de façon satisfaisante, l'indélectabilité de la mémoire centrale  $CD45RA^-CCR7^+$  chez les cas virémiques (58). Effectivement, il ne s'agit pas que d'un épuisement de la mémoire centrale ( $CD45RA^-CCR7^+ IL-2^+IFN-\gamma^-$ ,  $T_{CM}$ ) dû à une antigénémie élevée puisque les effecteurs  $CD45RA^-CCR7^- IFN-\gamma^+IL-2^-$  virus-spécifique ( $T_E$ ) restent détectables *ex vivo* dans des modèles de maladie virale chronique à haute virémie (LCMV (93), VIH (125,154,390)) alors qu'ils sont absents de la périphérie lors d'une infection au VHC. Aussi, l'échec dans l'activation des cellules naïves peut jouer un rôle, en synergie avec l'épuisement, dans la faible fréquence de cellules  $T_E IFN-\gamma^+$  détectées ainsi que dans le défaut du maintien de la mémoire  $CD4^+ T_{CM}$  rapporté chez des individus virémiques (162).

Le phénotype affiché par les dendritiques myéloïdes contenant du virus convertit probablement une rencontre avec une cellule T en un événement de tolérance – issue qui caractérise la présentation antigénique dans des souris  $MyD88^{-/-}$  (270,335) et  $TRAF6^{-/-}$  (176) qui sont incapables de produire des cytokines inflammatoires à la suite de l'engagement de leur TLR (164,171) et, par la même occasion, contrer la dominance négative qu'exercent les T régulateurs  $CD4^+25^+FOXP3^+$  sur le système de présentation (80,264,321,386) (Figure 8). Le recrutement de TRAF6 au sein de la voie MyD88-dépendante des TLR aboutit à l'activation de NF- $\kappa$ B (105), tel qu'illustré à la figure 7. Pasare et al. (271) ont démontré que l'expression de cytokines inflammatoires via la voie MyD88-dépendante des TLR chez des dendritiques matures ( $CD86^{++}CMH-II^{hi}$ ) n'est requise que pour la différenciation de cellules naïves en mémoire  $CD4^+$ , et non pour l'activation d'une mémoire déjà établie. Ainsi, l'inhibition de la transcription de gènes TLR-inductibles comme l'IL-

12 et le  $\text{TNF}\alpha$  dans des dendritiques infectées suggère que celles-ci sont probablement défectueuses *in vivo* dans leur capacité à potentialiser une réponse naïve  $\text{CD4}^+$  antigène-spécifique.

La capacité des dendritiques plasmacytoïdes à activer la mémoire antigène-spécifique  $\text{CD4}^+$  et  $\text{CD8}^+$  (90,221), alors qu'elles demeurent moins efficaces que les dendritiques myéloïdes non-infectées dans l'activation de cellules T naïves, notamment vis-à-vis des  $\text{CD4}^+$  (182), fournit une explication aux observations précédentes faisant cas de la préservation des réponses de rappel aux autres virus tels que la grippe et le CMV (169,220,227) et ce, malgré une activation déficitaire dans les individus infectés au VHC (173,375). Cette idée se trouve appuyée par la démonstration *in vitro* que les cellules plasmacytoïdes se révèlent n'être qu'un hôte viral incompetent pour le VHC par opposition aux dendritiques myéloïdes, qui intériorisent le virus et exécutent les étapes préliminaires dans la réplication du génome (163). Aussi, nous pouvons avancer qu'un tel mécanisme de tolérance est l'une des stratégies exploitées par ce virus pour induire l'effondrement des réponses  $\text{CD4}^+$  et  $\text{CD8}^+$  sur lesquelles repose la protection et, ainsi, favoriser sa persistance chez l'hôte. De fait, il a été montré que des dendritiques déficientes pour STAT3 produisaient des niveaux augmentés d'IL-12 et de CCL5, ces molécules inflammatoires étant impliquées dans la restauration de la réceptivité de  $\text{CD4}^+$  tolérantes de même que dans le renversement de la tolérance systémique (43).

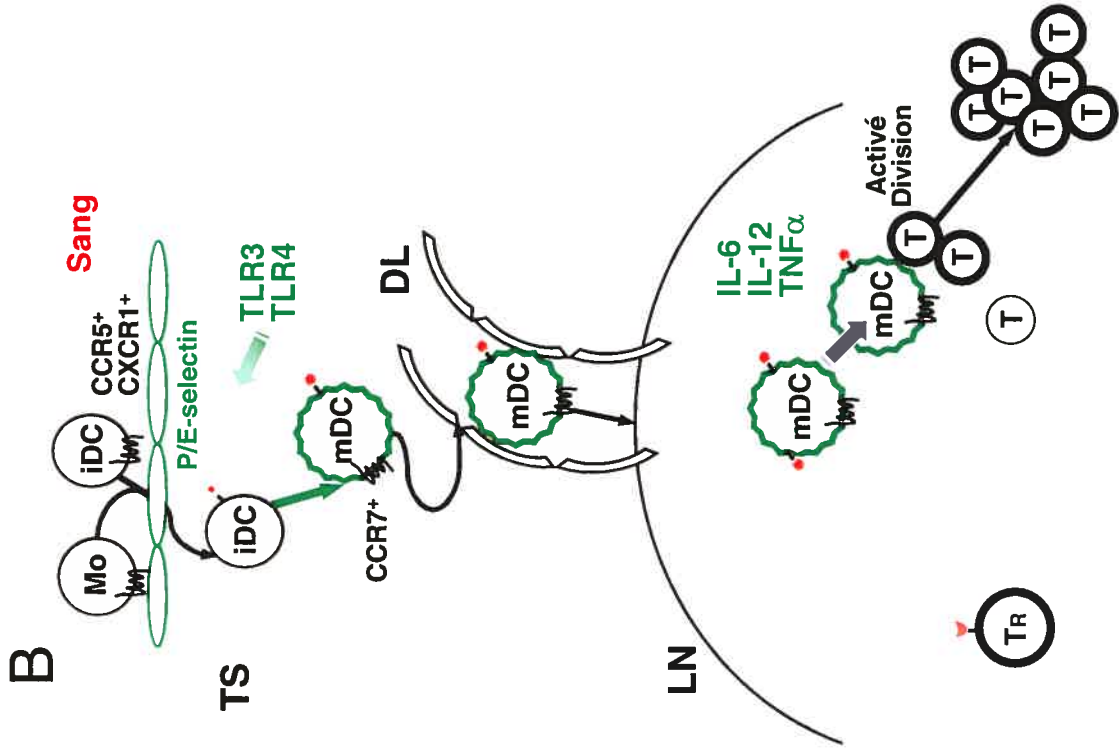
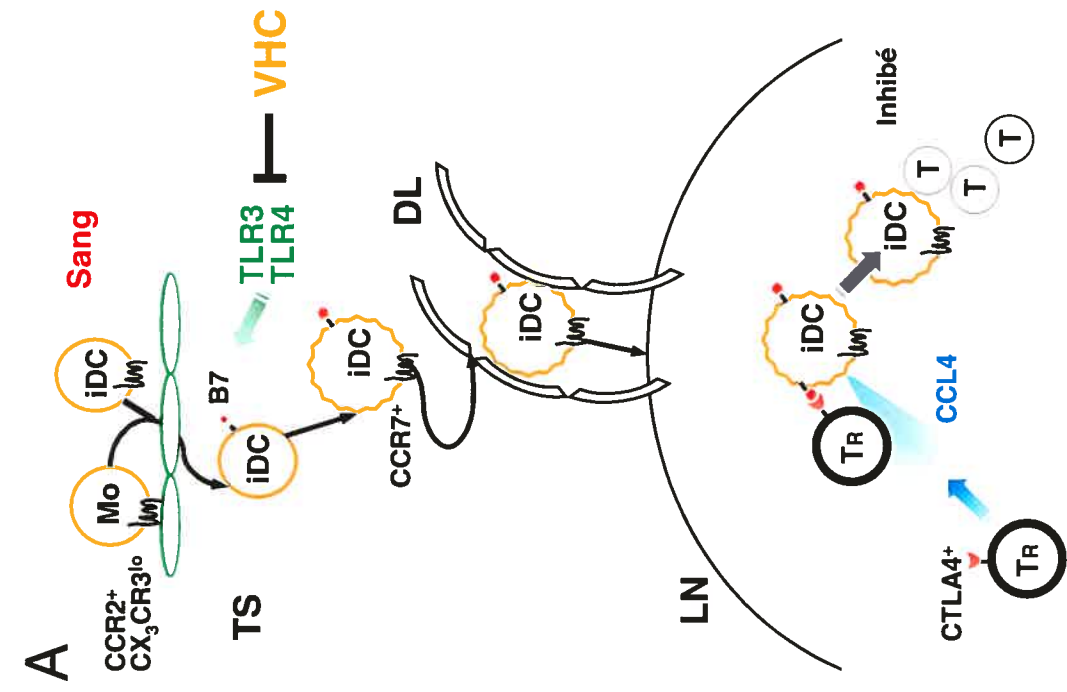


Figure 8. *Modèle conduisant à la perte de l'activation de l'immunité VHC-spécifique par l'inhibition de la réception des signaux de danger via les TLR dans les dendritiques du sang infectées avec le VHC*

En (A), à gauche, les dendritiques immatures du sang (iDC,  $CCR5^+CXCR1^+$ ) ou leurs précurseurs monocytaires (Mo,  $CCR2^+CX3CR3^{lo}$ ) infectés avec le VHC migrent aux ganglions lymphatiques drainants (LN) et présentent sur leur CMH des épitopes dérivés du virus. L'activation des cellules T réactives à ces peptides (T) est bloquée par les cellules T suppressives ( $T_R$ ), menant à une réponse infructueuse puisque les iDC infectées sont peu réceptives aux signaux de danger transmis par les TLR. En (B), à droite, les iDC n'étant pas infectées avec le VHC, elles atteignent les tissus (TS) où elles reçoivent les signaux de danger via leur TLR (illustré en vert, mDC) ce qui inaugure un reprogrammage génétique qui les mène à exprimer CCR7 à la surface. Elles migrent dans les régions riches en T des LN où elles interagissent avec les cellules T pour amorcer la réponse VHC-spécifique. La production de cytokines (i.e. IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ) par ces dendriques non-infectées en réponse au signal d'activation des TLR relâche les cellules T de l'activité suppressive des cellules  $T_R$ , menant à l'activation et à la division des T.



## 2. Conclusion

En résumé, les données accumulées suggèrent que le VHC exerce des effets inhibiteurs profonds sur le fonctionnement des dendritiques myéloïdes infectées, freinant peut-être le développement de l'immunité adaptative. Cette étude est la première à rapporter une interaction quantitativement importante entre le VHC et les dendritiques du sang, interaction qui soutient activement un mécanisme d'évasion immunitaire qui n'interfère qu'avec les fonctions des cellules ciblées. En soi, ces observations se prêtent bien au modèle qui prévaut actuellement (327), à savoir que l'aide décroissante et inadéquate des  $CD4^+$  VHC-spécifiques est responsable de l'échec des  $CD8^+$  à contenir l'évolution des mutants d'échappement (111,356) et à éviter la tolérance immunitaire vis-à-vis leur antigène (117,369). En effet, de récentes études dans des modèles murins montrent que le développement d'une mémoire  $CD8^+$  fonctionnelle dépend de la présence d'une aide  $CD4$  lors de l'activation (155,322,343). Sur la base de nos résultats, nous proposons un mécanisme plausible et spécifique pour expliquer en quoi le système immunitaire vient à être surchargé et se retrouve incapable de produire ou de maintenir à long terme des réponses mémoire  $CD4^+$  VHC-spécifiques. Ainsi, nous ajoutons une perspective manquante au modèle en plaçant les dendritiques comme intermédiaires critiques entre le VHC et la qualité des réponses des lymphocytes T.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Ackerman AL, Cresswell P 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature Immunology*, 5:678-84.
2. Agnello V. 1997. Hepatitis C virus infection and type II cryoglobulinemia: an immunological perspective. *Hepatology*, 26:1375-9.
3. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 96:12766-71.
4. Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 2:675-80.
5. Andrews DM, Andoniou CE, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Degli-Esposti MA. 2001. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nature Immunology*. 2:1077-84.
6. Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, Asaad R, Heinzl FP, Lederman MM, Lehmann PV, Valdez H. 2004. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *The Journal of Immunology*. 172:4907-16.
7. Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM. 2004. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology*. 324:450-61.
8. Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nature Immunology*. 2:1010-7.
9. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, Selves J, Puel J, Pascal JP, Duffaut M, Abbal M. 1997. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 113:1675-81.
10. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. 1999. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *New England Journal of Medicine*. 341:556-62.
11. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. 1989. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New England Journal of Medicine*. 321:1494-500.
12. Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *Journal of Virology*. 76:6841-4.
13. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine*. 8:379-85
14. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. 2001. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood*. 97:3171-6.
15. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. 2001. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*. 120:512-24.

16. Bain C, Parroche P, Lavergne JP, Duverger B, Vieux C, Dubois V, Komurian-Pradel F, Trepo C, Gebuhrer L, Paranhos-Baccala G, Penin F, Inchauspe G. 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*. 78:10460-9.
17. Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392:245-52.
18. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 18:767-811.
19. Barnes E, Ward SM, Kasprovicz VO, Dusheiko G, Klenerman P, Lucas M. 2004. Ultra-sensitive class I tetramer analysis reveals previously undetectable populations of antiviral CD8+ T cells. *European Journal of Immunology*. 34:1570-7.
20. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine*. 197:633-42.
21. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 278:41624-30.
22. Bassett SE, Guerra B, Brasky K, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR, Lanford RE. 2001. Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology*. 33:1479-87.
23. Beales LP, Holzenburg A, Rowlands DJ. 2003. Viral internal ribosome entry site structures segregate into two distinct morphologies. *Journal of Virology*. 77:6574-9.
24. Becker Y. 2002. Herpes simplex virus evolved to use the human defense mechanisms to establish a lifelong infection in neurons--a review and hypothesis. *Virus Genes*. 24:187-96.
25. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO Journal*. 15:12-22.
26. Beiske K, Langholm R, Godal T, Marton PF. 1986. T-zone lymphoma with predominance of plasmacytoid T-cells associated with myelomonocytic leukaemia - a distinct clinicopathological entity. *Journal of Pathology*. 150:247-55.
27. Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Rabourdin-Combe C. 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *European Journal of Immunology*. 28:221-36.
28. Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Thomas J, Fazekas de St Groth B, Pihlgren M, Marvel J, Rabourdin-Combe C. 1999. Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *International Immunology*. 11:1225-38.
29. Blindenbacher A, Duong FH, Hunziker L, Stutvoet ST, Wang X, Terracciano L, Moradpour D, Blum HE, Alonzi T, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. 2003. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology*. 124:1465-75.
30. Boisvert J, He XS, Cheung R, Keeffe EB, Wright T, Greenberg HB. 2001. Quantitative analysis of hepatitis C virus in peripheral blood and liver: replication detected only in liver. *Journal of Infectious Disease*. 184:827-35.

31. Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weiner AJ, Choo QL, Shuster JR, Kuo G, Bonino F, et al. 1993. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology*. 104:580-7.
32. Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zeldis JB. 1992. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *Journal of Infectious Disease*. 166:1276-80.
33. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, Fujita T, Hiscott J, Meurs EF. 2005. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *Journal of Virology*. 79:3969-78.
34. Bronowicki JP, Loriot MA, Thiers V, Grignon Y, Zignego AL, Brechot C. 1998. Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice. *Hepatology*. 28:211-8.
35. Buechler C, Ritter M, Quoc CD, Agildere A, Schmitz G. 1999. Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*. 262:251-4.
36. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminar of Liver Disease*. 15:41-63.
37. Cabot B, Esteban JI, Martell M, Genesca J, Vargas V, Esteban R, Guardia J, Gomez J. 1997. Structure of replicating hepatitis C virus (HCV) quasispecies in the liver may not be reflected by analysis of circulating HCV virions. *Journal of Virology*. 71:1732-4.
38. Castet V, Fournier C, Soulier A, Brillet R, Coste J, Larrey D, Dhumeaux D, Maurel P, Pawlotsky JM. 2002. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *Journal of Virology*. 76:8189-99.
39. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A. 2000. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Seminar of Immunopathology*. 22:345-69.
40. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine*. 5:919-23.
41. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*. 44:649-88.
42. Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loudis J, McHutchison JG, Alter HJ, Chisari FV. 2001. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 33:267-76.
43. Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP, Yu H, Jove R, Sotomayor EM. 2003. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*. 19:425-36.
44. Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I. 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature*. 418:988-94.
45. Cleary AM, Tu W, Enright A, Giffon T, Dewaal-Malefyt R, Gutierrez K, Lewis DB. 2003. Impaired accumulation and function of memory CD4 T cells in human IL-12 receptor beta 1 deficiency. *Journal of Immunology*. 170:597-603.

46. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology*. 5:1219-26.
47. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 10:439-49
48. Cramp ME, Carucci P, Underhill J, Naoumov NV, Williams R, Donaldson PT. 1998. Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. *Journal of Hepatology*. 29:207-13.
49. Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. 2000. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 118:346-55.
50. Cribier B, Schmitt C, Kirn A, Stoll-Keller F. 1998. Inhibition of hepatitis C virus adsorption to peripheral blood mononuclear cells by dextran sulfate. *Archives of Virology*. 143:375-9.
51. Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Forster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS. 2003. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nature Immunology*. 4:540-5.
52. Cucchiari M, Kammer AR, Grabscheid B, Diepolder HM, Gerlach TJ, Gruner N, Santantonio T, Reichen J, Pape GR, Cerny A. 2000. Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cellular Immunology*. 203:111-23.
53. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*. 162:3256-62.
54. Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. 2003. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *The Journal of Immunology*. 171:5165-71.
55. Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *Journal of Experimental Medicine*. 197:1141-51.
56. D'Amico G, Frascaroli G, Bianchi G, Transidico P, Doni A, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A. 2000. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nature Immunology*. 1:387-91.
57. Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD. 2002. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*. 76:12584-95.
58. Day CL, Seth NP, Lucas M, Appel H, Gauthier L, Lauer GM, Robbins GK, Szczepiorkowski ZM, Casson DR, Chung RT, Bell S, Harcourt G, Walker BD, Klenerman P, Wucherpfennig KW. 2003. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *Journal of Clinical Investigation*. 112:831-42.
59. Del Hoyo GM, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, Ardavin C. 2002. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature*. 415:1043-7.

60. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*. 271:348-50.
61. De Vos R, Verslype C, Depla E, Fevery J, Van Damme B, Desmet V, Roskams T. 2002. Ultrastructural visualization of hepatitis C virus components in human and primate liver biopsies. *Journal of Hepatology*. 37:370-9.
62. Di Bisceglie AM. 2000. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology*. 31:1014-8.
63. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet*. 346:1006-7.
64. Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR. 1997. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*. 71:6011-9.
65. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine*. 188:396-86.
66. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology*. 68:6147-60.
67. Dubuisson J. 2000. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 242:135-48.
68. Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. 2002. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends in Cellular Biology*. 12:517-23.
69. Ducoulombier D, Roque-Afonso AM, Di Liberto G, Penin F, Kara R, Richard Y, Dussaix E, Feray C. 2004. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology*. 39:817-25.
70. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *Journal of Experimental Medicine*. 194:1823-34.
71. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology*. 165:6037-46.
72. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Human Immunology*. 63:1133-48.
73. Eckels DD, Wang H, Bian TH, Tabatabai N, Gill JC. 2000. Immunobiology of hepatitis C virus (HCV) infection: the role of CD4 T cells in HCV infection. *Immunology Review*. 174:90-7.

74. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology*. 76:5974-84.
75. Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS. 2004. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *Journal of Virology*. 78:11393-400.
76. Eisen-Vandervelde AL, Yao ZQ, Hahn YS. 2004. The molecular basis of HCV-mediated immune dysregulation. *Clinical Immunology*. 111:16-21.
77. Engering A, Pieters J. 2001. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *International Immunology*. 13:127-34.
78. Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM. 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 15:883-95.
79. Erickson AL, Houghton M, Choo QL, Weiner AJ, Ralston R, Muchmore E, Walker CM. 1993. Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *The Journal of Immunology*. 151:4189-99.
80. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology*. 4:1206-12.
81. Fanning LJ, Kenny-Walsh E, Shanahan F. 2004. Persistence of hepatitis C virus in a white population: associations with human leukocyte antigen class 1. *Human Immunology*. 65:745-51.
82. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, et al. 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*. 258:135-40.
83. Farci P, Alter HJ, Wong DC, Miller RH, Govindarajan S, Engle R, Shapiro M, Purcell RH. 1994. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 91:7792-6.
84. Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzer A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93:15394-9.
85. Fearon DT, Carter RH. 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annual Review of Immunology*. 13:127-49.
86. Feau S, Facchinetti V, Granucci F, Citterio S, Jarrossay D, Seresini S, Protti MP, Lanzavecchia A, Ricciardi-Castagnoli P. 2004. Dendritic cell-derived IL2 production is regulated by IL15 both in humans and mice. *Blood*. (e-pub online)
87. Ferrari C, Valli A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti T, Schianchi C, Missale G, Marin MG, Fiaccadori F. 1994. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology*. 19:286-95.



88. Flint M, Quinn ER, Levy S. 2001. In search of hepatitis C virus receptor(s). *Clinical Liver Disease*. 5:873-93.
89. Ferreon JC, Ferreon AC, Li K, Lemon SM. 2005. Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *Journal of Biological Chemistry*. [Epub ahead of print]
90. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, Bhardwaj N. 2003. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood*. 101:3520-6.
91. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M. 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*. 300:1145-8.
92. Frese M, Schwarzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. 2002. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology*. 35:694-703.
93. Fuller MJ, Zajac AJ. 2003. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *Journal of Immunology*. 170:477-86.
94. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, Hengartner H, Zinkernagel R. 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *Journal of Experimental Medicine*. 187:1383-93.
95. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM. 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology*. 78:3480-8.
96. Gautier G, Humbert M, Deauvieau F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, Trinchieri G, Caux C, Garrone P. 2005. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. [Epub ahead of print].
97. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 100:575-85.
98. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 100:587-97.
99. Geissmann F, Jung S, Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 19:71-82.
100. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 117:933-41.
101. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechtler M, Backmund M, Pape GR. 2003. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*. 125:80-8.

102. Godkin A, Jeanguet N, Thursz M, Openshaw P, Thomas H. 2001. Characterization of novel HLA-DR11-restricted HCV epitopes reveals both qualitative and quantitative differences in HCV-specific CD4+ T cell responses in chronically infected and non-viremic patients. *European Journal of Immunology*. 31:1438-46.
103. Godkin A 2002. Evolution of epitope-specific memory CD4(+) T cells after clearance of hepatitis C virus. *The Journal of Immunology*,169:2210-2214
104. Goffard A, Dubuisson J. 2003. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie*. 85:295-301.
105. Gohda J, Matsumura T, Inoue J. 2004. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *Journal of Immunology*.173:2913-7.
106. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of Virology*. 77:5487-92.
107. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C. 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Disease*. 187:1951-8.
108. Gowans EJ, Jones KL, Bharadwaj M, Jackson DC. 2004. Prospects for dendritic cell vaccination in persistent infection with hepatitis C virus. *Journal of Clinical Virology*. 30:283-90.
109. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 90:10583-7.
110. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of Virology*. 67:1385-95.
111. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*. 302:659-62.
112. Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli P. 2003. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO Journal*. 22:2546-51.
113. Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nature Immunology*. 2:882-8.
114. Granucci F, Feau S, Angeli V, Trottein F, Ricciardi-Castagnoli P. 2003. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *The Journal of Immunology*. 170:5075-81.
115. Granucci F, Zanoni I, Pavelka N, Van Dommelen SL, Andoniou CE, Belardelli F, Degli Esposti MA, Ricciardi-Castagnoli P. 2004. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *Journal of Experimental Medecine*. 200:287-95.
116. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *Journal of Experimental Medecine*. 185:1101-11.

117. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. 2001. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *Journal of Virology*. 75:5550-8.
118. Gruener NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiari M, Cerny A, Pape GR. 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *Journal of Infectious Disease*. 181:1528-36.
119. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 4:25-36.
120. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. 2001. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *Journal of Virology*. 75:5550-8.
121. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 20:621-67.
122. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*. 425:397-402.
123. Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, Blixt O, Taylor ME, Weis WI, Drickamer K. 2004. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nature Structural Molecular Biology*. 11:591-8.
124. Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Dechanet-Merville J. 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*. 17:653-64.
125. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. 2004. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood*. 103:966-72.
126. Harcourt G, Hellier S, Bunce M, Satsangi J, Collier J, Chapman R, Phillips R, Klenerman P. 2001. Effect of HLA class II genotype on T helper lymphocyte responses and viral control in hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatology*. 8:174-9.
127. Harte MT, Haga IR, Maloney G, Gray P, Reading PC, Bartlett NW, Smith GL, Bowie A, O'Neill LA. 2003. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *Journal of Experimental Medicine*. 197:343-51.
128. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual Review of Immunology*. 18:275-308.
129. He XS, Reherrmann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, Wedemeyer H, Berenguer M, Wright TL, Davis MM, Greenberg HB. 1999. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral

- blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 96:5692-7.
130. Hertel L, Lacaille VG, Strobl H, Mellins ED, Mocarski ES. 2003. Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *Journal of Virology*. 77:7563-74.
  131. Hiasa Y, Horiike N, Akbar SM, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y, Onji M. 1998. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*. 249:90-5.
  132. Hiasa Y, Takahashi H, Shimizu M, Nuriya H, Tsukiyama-Kohara K, Tanaka T, Horiike N, Onji M, Kohara M. 2004. Major histocompatibility complex class-I presentation impaired in transgenic mice expressing hepatitis C virus structural proteins during dendritic cell maturation. *Journal of Medical Virology*. 74:253-61.
  133. Hilleman MR. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 101:14560-6.
  134. Hiroishi K, Kita H, Kojima M, Okamoto H, Moriyama T, Kaneko T, Ishikawa T, Ohnishi S, Aikawa T, Tanaka N, Yazaki Y, Mitamura K, Imawari M. 1997. Cytotoxic T lymphocyte response and viral load in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 25:705-12.
  135. Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, Lai JH. 2001 Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *The Journal of Immunology*. 166:1499-506.
  136. Hochrein H, Schlatter B, O'Keefe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M, Wagner H. 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 101:11416-21.
  137. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*. 424:743-8.
  138. Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. 2005. STAT3 regulates NF- $\kappa$ B recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood*. 105:689-696.
  139. Hoffmann RM, Diepolder HM, Zachoval R, Zwiebel FM, Jung MC, Scholz S, Nitschko H, Riethmuller G, Pape GR. 1995. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology*. 21:632-8.
  140. Honda K, Sakaguchi S, Nakajima C, Watanabe A, Yanai H, Matsumoto M, Ohteki T, Kaisho T, Takaoka A, Akira S, Seya T, Taniguchi T. 2003. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 100:10872-7.
  141. Hoofnagle JH. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*. 36:S21-9.
  142. Horny HP, Feller AC, Horst HA, Lennert K. 1987. Immunocytology of plasmacytoid T cells: marker analysis indicates a unique phenotype of this enigmatic cell. *Human Pathology*. 18:28-32.
  143. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*. 425:402-6.

144. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100:7271-6.
145. Igarashi O, Yanagida T, Azuma M, Okumura K, Nariuchi H. 1996. B7-1 synergizes with interleukin-12 in interleukin-2 receptor alpha expression by mouse T helper 1 clones. *European Journal of Immunology*. 26:300-6.
146. Inchauspe G. 2001. [Role of neutralizing antibodies and cellular immunity in hepatitis C virus infection] *Transfusion clinique Biologie*. 8:471-4.
147. Irie K, Mohan PM, Sasaguri Y, Putnak R, Padmanabhan R. 1989. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). *Gene*. 75:197-211.
148. Isaguliantz MG. 2003. Hepatitis C virus clearance: the enigma of failure despite an impeccable survival strategy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 4:169-83.
149. Ishida S, Kaito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohora K, Fujita N, Ikoma J, Adachi Y, Watanabe S. 2001. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatology Research*. 20:335-347
150. Ishido S, Fujita T, Hotta H. 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*. 244:35-40.
151. Itano AA, Jenkins MK. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology*. 4:733-9.
152. Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, Ehst BD, Ingulli E, Rudensky AY, Jenkins MK. 2003. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*. 19:47-57.
153. Iwasaki A, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 5:987-95.
154. Iyasere C, Tilton JC, Johnson AJ, Younes S, Yassine-Diab B, Sekaly RP, Kwok WW, Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Hallahan CW, Davey RT Jr, Dybul M, Vogel S, Metcalf J, Connors M. 2003. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *Journal of Virology*. 77:10900-9.
155. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*. 421:852-6.
156. Jankovic D, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, Collazo CM, Sher A. 2002. In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting. *Immunity*. 16:429-39.
157. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. 2001. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annual Review of Immunology*. 19:23-45.
158. Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X. 2004. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter

- inducing IFN-beta. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 101:3533-8.
159. Jones C. 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Review*. 16:79-95.
  160. Jones CA, Fernandez M, Herc K, Bosnjak L, Miranda-Saksena M, Boadle RA, Cunningham A. 2004. Herpes simplex virus type 2 induces rapid cell death and functional impairment of murine dendritic cells in vitro. *Journal of Virology*. 77:11139-49.
  161. Kabashima K, Banks TA, Ansel KM, Lu TT, Ware CF, Cyster JG. 2005. Intrinsic Lymphotoxin-beta Receptor Requirement for Homeostasis of Lymphoid Tissue Dendritic Cells. *Immunity*. 22:439-50.
  162. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Review Immunology*. 2:251-62.
  163. Kaimori A, Kanto T, Kwang Limn C, Komoda Y, Oki C, Inoue M, Miyatake H, Itose I, Sakakibara M, Yakushijin T, Takehara T, Matsuura Y, Hayashi N. 2004. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology*. 324:74-83.
  164. Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *Journal of Immunology*. 166:5688-94.
  165. Kalams SA, Walker BD. 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of Experimental Medecine*. 188:2199-204
  166. Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, Billingsley JM, Colbert DS, Jones NG, Shea AK, Trocha AK, Walker BD. 1999. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*. 73:6715-20.
  167. Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Matsuda T, Nakayama K, Harada M. 2004. The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *International Immunology*. 16:1173-9.
  168. Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, Ohkoshi S, Shimotohno K. 1993. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *Journal of Virology*. 67 :3923-30.
  169. Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. 1999. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *The Journal of Immunology*. 162:5584-91.
  170. Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. 2004. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Disease*. 190:1919-26.
  171. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 11:115-22.

172. Keck ZY, Sung VM, Perkins S, Rowe J, Paul S, Liang TJ, Lai MM, Fong SK. 2004. Human monoclonal antibody to hepatitis C virus E1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity. *Journal of Virology*. 78:7257-63.
173. Keefe EB, Iwarson S, McMahon BJ, Lindsay KL, Koff RS, Manns M, Baumgarten R, Wiese M, Fournau M, Safary A, Clemens R, Krause DS. 1998. Safety and immunogenicity of hepatitis A vaccine in patients with chronic liver disease. *Hepatology*. 27:881-6.
174. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 305:872-4.
175. Klenerman P, Lucas M, Barnes E, Harcourt G. 2002. Immunity to hepatitis C virus: stunned but not defeated. *Microbes Infection*. 4:57-65.
176. Kobayashi T, Walsh PT, Walsh MC, Speirs KM, Chiffolleau E, King CG, Hancock WW, Caamano JH, Hunter CA, Scott P, Turka LA, Choi Y. 2003. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity*. 19:353-63.
177. Komurian-Pradel F, Rajoharison A, Berland JL, Khouri V, Perret M, Van Roosmalen M, Pol S, Negro F, Paranhos-Baccala G. 2004. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 40:900-9.
178. Korenaga M, Hino K, Okazaki M, Okuda M, Okita K. 1997. Differences in hypervariable region 1 quasispecies between immune complexed and non-immune complexed hepatitis C virus particles. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*. 240:677-82.
179. Korenaga M, Hino K, Katoh Y, Yamaguchi Y, Okuda M, Yoshioka K, Okita K. 2001. A possible role of hypervariable region 1 quasispecies in escape of hepatitis C virus particles from neutralization. *Journal of Viral Hepatology*. 8:331-40.
180. Kovacs-Bankowski M, Rock KL. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*. 267:243-6.
181. Koziel MJ, Walker BD. 1997. Characteristics of the intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response in chronic hepatitis C virus infection. *Springer Seminar of Immunopathology*. 19:69-83.
182. Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A, Kanagawa O, Unanue ER, Colonna M, Cella M. 2003. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 197:899-906.
183. Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, Stelz G, Kuhnt C, Schuler G, Hauber J, Steinkasserer A. 2000. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *Journal of Virology*. 74:7127-36.
184. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. 2003. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nature Immunology*. 4:1169-76.
185. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108:717-25.
186. Kurts C, Carbone FR, Barnden M, Blanas E, Allison J, Heath WR, Miller JF. 1997. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of

- self-antigens and favors autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*. 186:2057-62.
187. Kuzushita N, Hayashi N, Moribe T, Katayama K, Kanto T, Nakatani S, Kaneshige T, Tatsumi T, Ito A, Mochizuki K, Sasaki Y, Kasahara A, Horii M. 1998. Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology*. 27:240-4.
  188. Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgili S, Balestrieri A, Purcell RH, Cao A, Farci P. 1994. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* 343:388-90.
  189. Lamprecht P, Moosig F, Gause A, Herlyn K, Csernok E, Hansen H, Gross WL. 2001. Immunological and clinical follow up of hepatitis C virus associated cryoglobulinaemic vasculitis. *Annual Rheumatoid Disease*. 60:385-90.
  190. Lancaster T, Sanders E, Christie JM, Brooks C, Green S, Rosenberg WM. 2002. Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatology*. 9:18-28.
  191. Landford RE, Chavez D, Chisari FV, Sureau C. 1995. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *Journal of Virology*. 69:8079-83.
  192. Lanford RE, Guerra B, Lee H, Averett DR, Pfeiffer B, Chavez D, Notvall L, Bigger C. 2003. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Journal of Virology*. 77:1092-104.
  193. Lang R, Pauleau AL, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ. 2003. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nature Immunology*. 4:546-50.
  194. Lanzavecchia A, Sallusto F. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science*. 290:92-7.
  195. Lanzavecchia A, Sallusto F. 2000. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Current Opinions in Immunology*. 12:92-8.
  196. Lanzavecchia A, Sallusto F. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nature Immunology*. 2:487-92.
  197. Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS. 1999. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *The Journal of Immunology*. 162(2):931-8.
  198. Larsson M, Babcock E, Grakoui A, Shoukry N, Lauer G, Rice C, Walker C, Bhardwaj N. 2004. Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *Journal of Virology*. 78:6151-61.
  199. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Cianciara J, Vargas H, Rakela J. 1997. Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extrahepatic replication. *Journal of General Virology*. 78:2747-50.
  200. Laskus T, Radkowski M, Piasek A, Nowicki M, Horban A, Cianciara J, Rakela J. 2000. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Journal of Infectious Disease*. 181:442-8.



201. Laskus T, Radkowski M, Jablonska J, Kibler K, Wilkinson J, Adair D, Rakela J. 2004. Human immunodeficiency virus facilitates infection/replication of hepatitis C virus in native human macrophages. *Blood*. 103:3854-9
202. Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, Robbins GK, Casson DR, Reiser M, Dusheiko G, Allen TM, Chung RT, Walker BD, Klenerman P. 2004. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 127:924-36.
203. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *Journal of Experimental Medicine*. 191:1499-512.
204. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. 2000. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *European Journal of Immunology*. 30:2479-87.
205. Lee CH, Choi YH, Yang SH, Lee CW, Ha SJ, Sung YC. 2001. Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages. *Virology*. 279:271-9.
206. Lennert K, Kaiserling E, Muller-Hermelink HK. 1975. Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet*. 1:1031-2.
207. Lerat H, Berby F, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspe G. 1996. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *Journal of Clinical Investigation*. 97:845-51.
208. Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trepo C, Inchauspe G. 1998. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood*. 91:3841-9.
209. Levy S, Todd SC, Maecker HT. 1998. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annual Review of Immunology*. 16:89-109.
210. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 102:2992-7.
211. Li X, Jeffers LJ, Shao L, Reddy KR, de Medina M, Scheffel J, Moore B, Schiff ER. 1995. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *Journal of Viral Hepatology*. 2:227-34.
212. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. 2001. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *Journal of Virology*. 75:3501-8.
213. Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature Medicine*. 6:1348-54.
214. Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. 2005. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology*. 128:1034-41.

215. Liu YJ. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 106:259-62.
216. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology*. 2:585-9.
217. Liu YJ. 2004. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology*. (e-pub online)
218. Liu ZX, Nishida H, He JW, Lai MM, Feng N, Dennert G. 2004. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. *Journal of Virology*. 76:990-7.
219. Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R. 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology*. 71:8416-28.
220. Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. 2004. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood*. 103:1026-9.
221. Lore K, Betts MR, Brenchley JM, Kuruppu J, Khojasteh S, Perfetto S, Roederer M, Seder RA, Koup RA. 2003. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *Journal of Immunology*. 171:4320-8.
222. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. 2003. DC-SIGN and L-SIGN receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of Biological Chemistry*. 278:20358-66.
223. Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R. 2004. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *Journal of Biological Chemistry*. 279:32035-45.
224. Lu HH, Wimmer E. 1996. Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93:1412-7
225. Lu HT, Yang DD, Wysk M, Gatti E, Mellman I, Davis RJ, Flavell RA. 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO Journal*. 18:1845-57.
226. Lu H, Li W, Noble WS, Payan D, Anderson DC. 2004. Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *Journal of Proteome Research*. 35:949-57.
227. Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, Phillips R, Klenerman P. 2004. Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*. 172:1744-53.
228. Ludwig IS, Lekkerkerker AN, Depla E, Bosman F, Musters RJ, Depraetere S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. 2004. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *Journal of Virology*. 78:8322-32.
229. Lukavsky PJ, Kim I, Otto GA, Puglisi JD. 2003. Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nature Structural Molecular Biology*. 10:1033-8.

230. Lytle JR, Wu L, Robertson HD. 2002. Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *RNA*. 8:1045-55.
231. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *The Journal of Immunology*. 154:5071-9.
232. MacDonald AS, Pearce EJ. 2002. Cutting edge: polarized Th cell response induction by transferred antigen-pulsed dendritic cells is dependent on IL-4 or IL-12 production by recipient cells. *The Journal of Immunology*. 168:3127-30.
233. Mackenzie JM, Westaway EG. 2001. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *Journal of Virology*. 75:10787-99.
234. Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Giorgi M, Morrica A, Pistello M, Cammarota G, Marchi S, Ciccorossi P, Bionda A, Bendinelli M. 1997. Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *Journal of General Virology*. 78:1521-5.
235. Major ME, Mihalik K, Puig M, Rehmann B, Nascimbeni M, Rice CM, Feinstone SM. 2002. Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *Journal of Virology*. 76:6586-95.
236. Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, Modola G, Agostiano V, Gaudiano C, Andriulli A. 1999. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *Journal of Hepatology*. 30(6):984-9.
237. Marth T, Zeitz M, Ludviksson BR, Strober W, Kelsall BL. 1999. Extinction of IL-12 signaling promotes Fas-mediated apoptosis of antigen-specific T cells, *Journal of Immunology*. 162:7233-40.
238. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. 1994. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of Virology*. 68:8056-63
239. Matsui M, Moriya O, Abdel-Aziz N, Matsuura Y, Miyamura T, Akatsuka T. 2002. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine*. 21:211-20.
240. McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO Journal*. 21:3980-8.
241. Mehta SH, Cox A, Hoover DR, Wang XH, Mao Q, Ray S, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet*. 359:1478-83.
242. Mellman I, Steinman RM. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 106:255-8.
243. Mellor J, Haydon G, Blair C, Livingstone W, Simmonds P. 1998. Low level or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of General Virology*. 79:705-14.
244. Mikloska Z, Bosnjak L, Cunningham AL. Immature monocyte-derived dendritic cells are productively infected with herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*. 75:5958-64.

245. Miller RH, Purcell RH. 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 87:2057-61.
246. Minkyung Y, Lemon SM. 2003. Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA*. 9:331-45.
247. Minton EJ, Smillie D, Neal KR, Irving WL, Underwood JC, James V. 1998. Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. Members of the Trent Hepatitis C Virus Study Group. *Journal of Infectious Disease*. 178:39-44.
248. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. 1996. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *Journal of Clinical Investigation*. 98:706-14.
249. Mittelbrunn M, Yanez-Mo M, Sancho D, Ursa A, Sanchez-Madrid F. 2002. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *The Journal of Immunology*. 169:6691-5.
250. Moldvay J, Deny P, Pol S, Brechot C, Lamas E. 1994. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by in situ hybridization. *Blood*. 83:269-73.
251. Morsica G, Tambussi G, Sitia G, Novati R, Lazzarin A, Lopalco L, Mukenge S. 1999. Replication of hepatitis C virus in B lymphocytes (CD19+). *Blood*. 94:1138-9.
252. Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. 2003. Structure of West Nile virus. *Science*. 302:248.
253. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*. 292:1907-10.
254. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. 2004. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinical Experimental Immunology*. 137:559-65.
255. Muratori L, Gibellini D, Lenzi M, Cataleta M, Muratori P, Morelli MC, Bianchi FB. 1996. Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*. 88:2768-74.
256. Nascimbeni M, Mizukoshi E, Bosmann M, Major ME, Mihalik K, Rice CM, Feinstone SM, Rehermann B. 2003. Kinetics of CD4+ and CD8+ memory T-cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *Journal of Virology*. 77:4781-93.
257. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Report*. 4:723-8.
258. Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F. 2002. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *Journal of Medical Virology*. 67:152-61.

259. Navas S, Martin J, Quiroga JA, Castillo I, Carreno V. 1998. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients. *Journal of Virology*. 72:1640-6.
260. Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, Rice CM, Wong J, Houghton M, Lau JY. 1997. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *The Journal of Immunology*. 158:1473-81.
261. Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. 1999. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology*. 29:217-22.
262. Op De Beeck A, Dubuisson J. 2003. Topology of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Review of Medical Virology*. 13:233-41.
263. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 13:715-25.
264. Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, Bozza S, Volpi C, Salomon BL, Fioretti MC, Romani L, Puccetti P. 2004. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nature Immunology*. 5:1134-42.
265. Orland JR, Wright TL, Cooper S. 2001. Acute hepatitis C. *Hepatology*. 33(2):321-7.
266. Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T, Omata M. 2005. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology*. 41:1004-12.
267. Oxenius A, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1998. Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4+ and CD8+ T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity*. 9:449-57.
268. Pape GR, Gerlach TJ, Diepolder HM, Gruner N, Jung M, Santantonio T. 1999. Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus. *Journal of Viral Hepatology*. 6:36-40.
269. Park AY, Hondowicz BD, Scott P. 2000. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *Journal of Immunology*. 165(2):896-902.
270. Pasare C, Medzhitov R. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. 299:1033-6.
271. Pasare C, Medzhitov R. 2004. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*. 21:733-41.
272. Pasare C, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Seminars in Immunology*. 16:23-6.
273. Pendl GG, Robert C, Steinert M, Thanos R, Eytner R, Borges E, Wild MK, Lowe JB, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Vestweber D, Grabbe S. 2002. Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood*. 99:946-56.
274. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL,

- To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*. 61:779-90.
275. Pham TN, Macparland SA, Coffin CS, Lee SS, Bursey FR, Michalak TI. 2005. Mitogen-induced upregulation of hepatitis C virus expression in human lymphoid cells. *Journal of General Virology*. 86:657-66.
276. Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV, Michalak TI. 2004. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *Journal of Virology*. 78:5867-74.
277. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282:938-41.
278. Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology*. 77:4070-80.
279. Prince AM, Brotman B, Huima T, Pascual D, Jaffery M, Inchauspe G. 1992. Immunity in hepatitis C infection. *Journal of Infectious Disease*. 165:438-43.
280. Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. 2001. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science*. 293:253-6.
281. Racanelli V, Rehermann B. 2003. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends in Immunology*. 24:456-64.
282. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Colby TV, Walewska-Zielecka B, Kubicka J, Wilkinson J, Adair D, Rakela J, Laskus T. 2005. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 41:106-14.
283. Radkowski M, Horban A, Gallegos-Orozco JF, Pawelczyk A, Jablonska J, Wilkinson J, Adair D, Laskus T. 2005. Evidence for viral persistence in patients who test positive for anti-hepatitis C virus antibodies and have normal alanine aminotransferase levels. *Journal of Infectious Disease*. 191:1730-3.
284. Radkowski M, Bednarska A, Horban A, Stanczak J, Wilkinson J, Adair DM, Nowicki M, Rakela J, Laskus T. 2004. Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. *Journal of General Virology*. 85:47-59.
285. Raftery MJ, Schwab M, Eibert SM, Samstag Y, Walczak H, Schonrich G. 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity*. 15:997-1009.
286. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*. 282:480-3.
287. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*. 11:753-61.
288. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. 2002. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *Journal of Experimental Medicine*. 196:517-27.

289. Ray RB, Steele R, Basu A, Meyer K, Majumder M, Ghosh AK, Ray R. 2002. Distinct functional role of Hepatitis C virus core protein on NF-kappaB regulation is linked to genomic variation. *Virus Research*. 87:21-9.
290. Reed KE, Rice CM. 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 242:55-84.
291. Rehermann B, Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, Chisari FV. 1996. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *Journal of Virology*. 70:7092-102.
292. Rehermann B, Chang KM, McHutchison JG, Kokka R, Houghton M, Chisari FV. 1996. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Investigation*. 98:1432-40.
293. Rehermann B. 2000. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Seminar of Liver Disease*. 20:127-41.
294. Riegler S, Hebart H, Einsele H, Brossart P, Jahn G, Sinzger C. 2000. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*. 81:393-9.
295. Rollier C, Drexhage JA, Verstrepen BE, Verschoor EJ, Bontrop RE, Koopman G, Heeney JL. 2003. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology*. 38:851-8.
296. Rollier C, Depla E, Drexhage JA, Verschoor EJ, Verstrepen BE, Fatmi A, Brinster C, Fournillier A, Whelan JA, Whelan M, Jacobs D, Maertens G, Inchauspe G, Heeney JL. 2004. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *Journal of Virology*. 78:187-96.
297. Roque Afonso AM, Jiang J, Penin F, Tareau C, Samuel D, Petit MA, Bismuth H, Dussaix E, Feray C. 1999. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *Journal of Virology*. 73:9213-21.
298. Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner AJ, Lau JY, Choo QL, Chien D, Pileri P, Houghton M, Abrignani S. 1996. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93:1759-63.
299. Rosen HR, Hinrichs DJ, Gretch DR, Koziel MJ, Chou S, Houghton M, Rabkin J, Corless CL, Bouwer HG. 1999. Association of multispecific CD4(+) response to hepatitis C and severity of recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology*. 117:926-32.
300. Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, Bouwer HG, Hinrichs DJ. 2002. Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology*. 35:190-8.
301. Saccani S, Pantano S, Natoli G. 2001. Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *Journal of Experimental Medicine*. 193:1351-9.

302. Saccani S, Natoli G. 2002. Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes and Development*. 16:2219-24.
303. Saccani S, Pantano S, Natoli G. 2002. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nature Immunology*. 3:69-75
304. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*. 28:2760-9.
305. Sallusto F, Lanzavecchia A. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunology Review*. 177:134-40.
306. Sansonno D, Lotesoriere C, Cornacchiulo V, Fanelli M, Gatti P, Iodice G, Racanelli V, Dammacco F. 1998. Hepatitis C virus infection involves CD34(+) hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. *Blood*. 92:3328-37.
307. Sansonno D, De Vita S, Iacobelli AR, Cornacchiulo V, Boiocchi M, Dammacco F. 1998. Clonal analysis of intrahepatic B cells from HCV-infected patients with and without mixed cryoglobulinemia. *Journal of immunology*. 160:3594-601.
308. Sansonno D, Iacobelli AR, Cornacchiulo V, Iodice G, Dammacco F. 1996. Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Journal of Clinical Experimental Immunology*. 103:414-21.
309. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. 2002. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *Journal of Virology*. 76:5062-70.
310. Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribillaga L, Arina A, Melero I, Borrás-Cuesta F, Prieto J. 2003. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *Journal of Virology*. 77:10862-71.
311. Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. 2000. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology*. 270(2):476-87.
312. Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P, Kohn LD. 2003. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *Journal of Virology*. 77:546-59.
313. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO Journal*. 21:5017-25.
314. Schmidt CS, Mescher MF. 1999. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *The Journal of Immunology*. 163:2561-7.
315. Schmidt WN, Stapleton JT, LaBrecque DR, Mitros FA, Kirby PA, Phillips MJ, Brashear DL. 2000. Hepatitis C virus (HCV) infection and cryoglobulinemia: analysis of whole blood and plasma HCV-RNA concentrations and correlation with liver histology. *Hepatology*. 31:737-44.



316. Schmidt CS, Mescher MF. 2002. Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *The Journal of Immunology*. 168:5521-9.
317. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 2:947-50.
318. Schirren CA, Jung MC, Gerlach JT, Worzfeld T, Baretton G, Mamin M, Hubert Gruener N, Houghton M, Pape GR. 2000. Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma. *Hepatology*. 32:597-603.
319. Schupper H, Hayashi P, Scheffel J, Aceituno S, Paglieroni T, Holland PV, Zeldis JB. 1993. Peripheral-blood mononuclear cell responses to recombinant hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 18:1055-60.
320. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 19:59-70.
321. Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, Verdaguer J, Santamaria P. 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity*. 19:877-89.
322. Shedlock DJ, Shen H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*. 300:337-9.
323. Shi ST, Lee KJ, Aizaki H, Hwang SB, Lai MM. 2003. Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *Journal of Virology*. 77:4160-8.
324. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. 1996. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology*. 23:205-9.
325. Shortman K, Liu YJ. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Review Immunology*. 2:151-61.
326. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, Walker CM. 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine*. 197:1645-55.
327. Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. 2004. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annual Review of Microbiology*. 58:391-424.
328. Shrivastava A, Manna SK, Ray R, Aggarwal BB. 1998. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *Journal of Virology*. 72:9722-8.
329. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 284:1835-7.
330. Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, Belz GT. 2004. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nature Immunology*. 5:1143-8.

331. Sobao Y, Tomiyama H, Nakamura S, Sekihara H, Tanaka K, Takiguchi M. 2001. Visual demonstration of hepatitis C virus-specific memory CD8(+) T-cell expansion in patients with acute hepatitis C. *Hepatology*. 33(1):287-94.
332. Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *Journal of Experimental Medicine*. 186:1819-29
333. Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, D'Amico G, Power CA, Wells TN, Gobbi M, Allavena P, Mantovani A. 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *The Journal of Immunology*. 159:1993-2000.
334. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *The Journal of Immunology*. 161:1083-6.
335. Spörri R, Reis E, Sousa C. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4(+) T cell populations lacking helper function. *Nature Immunology*. 6:163-170.
336. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferons. *Annual Review in Biochemistry*. 67:227-64.
337. Steffan A, Marianneau P, Caussin-Schwemling C, Royer C, Schmitt C, Jaeck D, Wolf P, Gendrault J, Stoll-Keller F. 2001. Ultrastructural observations in hepatitis C virus-infected lymphoid cells. *Microbes Infection*. 3:193-202.
338. Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*. 137:1142-62.
339. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 21:685-711.
340. Steinmann D, Barth H, Gissler B, Schurmann P, Adah MI, Gerlach JT, Pape GR, Depla E, Jacobs D, Maertens G, Patel AH, Inchauspe G, Liang TJ, Blum HE, Baumert TF. 2004. Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *Journal of Virology*. 78:9030-40.
341. Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA. 2000. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 97:8427-32.
342. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. 2003. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology*. 38:1437-48.
343. Sun JC, Bevan MJ. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science*. 300:339-42.
344. Sun JC, Williams MA, Bevan MJ. 2004. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nature Immunology*. 5:927-33.

345. Sung VM, Shimodaira S, Doughty AL, Picchio GR, Can H, Yen TS, Lindsay KL, Levine AM, Lai MM. 2003. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *Journal of Virology*. 77:2134-46.
346. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature Medicine*. 6:578-82.
347. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. 2004. *Seminars in Immunology*. 16:3-9.
348. Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annual Review in Immunology*. 21:335-76.
349. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 10:39-49.
350. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 197:823-9.
351. Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski J, Carrington M, Thomas DL. 2002. HLA-Cw\*04 and hepatitis C virus persistence. *Journal of Virology*. 76:4792-7.
352. Thery C, Amigorena S. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinions in Immunology*. 13:45-51.
353. Timme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 99:15661-8.
354. Timme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine*. 194:1395-406.
355. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. 1999. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet*. 354:2119-24.
356. Timm J, Lauer GM, Kavanagh DG, Sheridan I, Kim AY, Lucas M, Pillay T, Ouchi K, Reyor LL, Zur Wiesch JS, Gandhi RT, Chung RT, Bhardwaj N, Klenerman P, Walker BD, Allen TM. 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *Journal of Experimental Medicine*. 200:1593-604.
357. Torresi J, Bharadwaj M, Jackson DC, Gowans EJ. 2004. Neutralising antibody, CTL and dendritic cell responses to hepatitis C virus: a preventative vaccine strategy. *Current Drug Targets*. 5:41-56.
358. Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Review Immunology*. 2003 Feb;3(2):133-46.
359. Tsubouchi E, Akbar SM, Horiike N, Onji M. 2004. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Gastroenterology*. 39:754-62.

360. Tsubouchi E, Akbar SM, Murakami H, Horiike N, Onji M. 2004. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Journal of Clinical Experimental Immunology*. 137:417-23.
361. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology*. 66:1476-83.
362. Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, Mellman I. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*. 288:522-7.
363. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. 2003. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*. 37:1189-98.
364. Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, Raimondo G, Ferrari C. 2002. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *Journal of Virology*. 76:12423-34.
365. Valenzuela J, Schmidt C, Mescher M. 2002. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. *The Journal of Immunology*. 169:6842-9.
366. Vanbervliet B, Homey B, Durand I, Massacrier C, Ait-Yahia S, de Bouteiller O, Vicari A, Caux C. 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *European Journal of Immunology*. 32:231-42.
367. Van Compernelle SE, Levy S, Todd SC. 2001. Anti-CD81 activates LFA-1 on T cells and promotes T cell-B cell collaboration. *European Journal of Immunology*. 31:823-31.
368. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. 2004. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature medicine*. 10:48-54.
369. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. 2002. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of Immunology*. 169:3447-58.
370. Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, Hughes AL, Houghton M, Walker CM. 1995. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92:2755-9.
371. Weiner AJ, Paliard X, Selby MJ, Medina-Selby A, Coit D, Nguyen S, Kansopon J, Arian CL, Ng P, Tucker J, Lee CT, Polakos NK, Han J, Wong S, Lu HH, Rosenberg S, Brasky KM, Chien D, Kuo G, Houghton M. 2001. Intrahepatic genetic inoculation of hepatitis C virus RNA confers cross-protective immunity. *Journal of Virology*. 75:7142-8.
372. Weinmann AS, Plevy SE, Smale ST. 1999. Rapid and selective remodeling of a positioned nucleosome during the induction of IL-12 p40 transcription. *Immunity*. 11:665-75.

373. Weinmann AS, Mitchell DM, Sanjabi S, Bradley MN, Hoffmann A, Liou HC, Smale ST. 2001. Nucleosome remodeling at the IL-12 p40 promoter is a TLR-dependent, Rel-independent event. *Nature Immunology*. 2:51-7.
374. Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG, Yin Z, Kano A, Iwamoto Y, Li E, Craft JE, Bothwell AL, Fikrig E, Koni PA, Flavell RA, Fu XY. 2003. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100:1879-84.
375. Wiedmann M, Liebert UG, Oesen U, Porst H, Wiese M, Schroeder S, Halm U, Mossner J, Berr F. 2000. Decreased immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 31:230-4.
376. Willberg C, Barnes E, Klenerman P. 2003. HCV immunology--death and the maiden T cell. *Cell Death Differentiation*. 10:S39-47
377. Witherden DA, Boismenu R, Havran WL. 2000. CD81 and CD28 costimulate T cells through distinct pathways. *The Journal of Immunology*. 165:1902-9.
378. Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB, Lauer GM, Chung RT, Thomas DL, Walker BD. 2001. Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *Journal of Virology*. 75:1229-35.
379. Wu CY, Kirman JR, Rotte MJ, Davey DF, Perfetto SP, Rhee EG, Freidag BL, Hill BJ, Douek DC, Seder RA. 2002. Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nature Immunology*. 3:852-8.
380. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*. 6:816-20.
381. Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO Journal*. 20:3840-8
382. Xu Z, Choi J, Lu W, Ou JH. 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*. 77:1578-83.
383. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*. 4:1144-50.
384. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301:640-3.
385. Yang SH, Lee CG, Lee CW, Choi EJ, Yoon SK, Ahn KS, Sung YC. 2002. Hepatitis C virus core inhibits the Fas-mediated p38 mitogen activated kinase signaling pathway in hepatocytes. *Molecular Cell*. 13:452-62.
386. Yang Y, Huang CT, Huang X, Pardoll DM. 2004. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nature Immunology*. 5:508-15.
387. Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, Subbarao K, Nabel GJ. 2004. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome

- coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *Journal of Virology*. 78:5642-50.
388. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A. 2003. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nature Immunology*. 4:551-6.
389. Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A. 2002. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *Journal of Experimental Medicine*. 196:641-53.
390. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, Sekaly RP. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *Journal of Experimental Medicine*. 198:1909-22.
391. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *Journal of Experimental Medicine*. 188:2205-13.
392. Zehender G, Meroni L, De Maddalena C, Varchetta S, Monti G, Galli M. 1997. Detection of hepatitis C virus RNA in CD19 peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *Journal of Infectious Disease*. 76:1209-14.
393. Zhang X, Brunner T, Carter L, Dutton RW, Rogers P, Bradley L, Sato T, Reed JC, Green D, Swain SL. 1997. Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 185:1837-49.
394. Zhang S, Lawless VA, Kaplan MH. 2000. Cytokine-stimulated T lymphocyte proliferation is regulated by p27Kip1. *Journal of Immunology*. 165:6270-7.
395. Zhu F, Eckels DD. 2002. Functionally distinct helper T-cell epitopes of HCV and their role in modulation of NS3-specific, CD8+/tetramer positive CTL. *Human Immunology*. 63:710-8.
396. Zitron IM, Laurinaitis M, Qu L, Silverman AL, Gordon SC. 2000. Immunological responses in patients who have spontaneously eradicated hepatitis C virus infection. *Viral Immunology*. 13:521-31.