



HAL
open science

Etude des Populations Lymphocytaires Expriment des Récepteurs Spécifiques de Molécules HLA de Classe I au cours de l'Hépatite Virale C Chronique.

Paula Bonorino

► **To cite this version:**

Paula Bonorino. Etude des Populations Lymphocytaires Expriment des Récepteurs Spécifiques de Molécules HLA de Classe I au cours de l'Hépatite Virale C Chronique.. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00114768

HAL Id: tel-00114768

<https://theses.hal.science/tel-00114768>

Submitted on 17 Nov 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université Joseph Fourier-Grenoble
UFR de Biologie**

THESE

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Joseph Fourier
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

**Discipline : Biologie
Au titre de la formation doctorale
Chimie et Sciences du vivant**

Présentée par

Paula Bonorino

**Etude des Populations Lymphocytaires
Exprimant des Récepteurs Spécifiques de Molécules HLA de Classe I
au cours de l'Hépatite Virale C Chronique.**

Soutenue publiquement le 17 octobre 2006 devant le jury suivant :

Pr. Michel ROBERT-NICOUD	Président
Dr. Julie DECHANET-MERVILLE	Rapporteur
Pr. Fabien ZOULIM	Rapporteur
Dr. Joël PLUMAS	Examineur
Dr. Evelyne JOUVIN-MARCHE	Directeur

Thèse préparée au laboratoire d'Immunochimie
INSERM U 548, Département Réponse et Dynamique Cellulaire CEA-Grenoble
Université Joseph Fourier

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce à une collaboration continue entre le service d'Hépatogastroentérologie du C.H.U. de Grenoble et l'unité mixte INSERM U548/CEA-DRDC/Université Joseph Fourier-Grenoble 1.

Je remercie le Dr. Patrice Marche pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche et qui m'a permis de travailler sur ce projet à l'interface de l'immunologie fondamentale et de la recherche clinique.

Je remercie le Dr. Evelyne Jouvin-Marche pour m'avoir accueilli dans son équipe et avoir assuré la direction de ce travail malgré ses nombreuses fonctions.

Merci au Dr. Vincent Leroy pour avoir co-dirigé ce travail, pour sa disponibilité et son apport durant l'analyse des résultats.

Je suis reconnaissante au Pr. Jean-Pierre Zarski pour avoir facilité la réalisation de ces études et pour son intérêt pour ce travail.

Merci au Dr. Martine Pernollet, Dr. Marie Christine Jacob, Agnès Colomer, Silvie Glaizal ainsi qu'au reste du personnel de l'EFS pour leur aide précieuse.

Merci aux membres de l'unité U548 pour leur aide directe ou indirecte qui a facilité et contribué à la réalisation de mon travail de thèse. Merci à Tania Dufeu-Duchesne par sa gentillesse et ses conseils techniques.

Je remercie particulièrement les Dr. Julie Dechanet-Merville et le Pr. Fabien Zoulim pour avoir accepté la tâche de rapporteur de ce travail.

Merci aux Dr. Joël Plumas et au Pr. Michel Robert Nicoud pour avoir bien voulu participé au jury chargé d'évaluer ce travail.

Merci aux nombreux patients qui ont rendu ces études possibles. A Agnès Plages pour la gestion des dossiers cliniques et sa disponibilité.

Je tiens aussi à remercier l'Agence Nationale pour la recherche sur le Sida et les Hépatites virales (ANRS) pour avoir financé ce travail.

Merci à Mathias Faure et à Christophe Viret pour les discussions et conseils scientifiques.

Merci beaucoup au Dr Jorge Geffner de l'Académie Nationale de Médecine de Buenos Aires, Argentine; qui transmet sa passion par l'Immunologie à travers l'enseignement.

Merci à toute ma famille qui est toujours près de moi malgré la distance.

TABLE DES MATIERES

OBJECTIFS	i
INTRODUCTION GENERALE	
I – La réponse immunitaire	1
Généralités sur les cellules du système immunitaire	2
Les macrophages et polynucléaires	3
Apprêtement et présentation des antigènes par les cellules présentatrices	3
Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité	3
Apprêtement et présentation des antigènes	4
Les cellules dendritiques	5
Les lymphocytes B	6
Les lymphocytes T, développement et physiologie	7
Le développement des lymphocytes T	7
Les lymphocytes T périphériques	8
Polarisation de la réponse lymphocytaire CD4+	9
L'activité des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL)	10
Les lymphocytes T NK (NK-T)	11
Les cellules tueuses naturelles ou Natural Killers (NK)	11
Le développement des cellules NK humaines	12
Sous populations de cellules NK chez l'homme	12
La cytotoxicité des cellules NK	13
Récepteurs activateurs des cellules NK humaines	13
Corécepteurs présents sur les cellules NK	14
Récepteurs inhibiteurs des cellules NK humaines	15
Expression de NKRs par les populations NK CD56 ^{dim} et NK CD56 ^{bright}	16
Génétique des récepteurs KIR.	16
Expression de récepteurs de cellules NK par des sous populations de lymphocytes T activés/mémoires.	17
Expression des KIRs par les lymphocytes T	17
Expression de NKG2A/CD94 par les lymphocytes T	18
Expression d'autres récepteurs NK par les lymphocytes T	19
II – Fonctions et organisation du foie	30
Généralités	30

Populations lymphocytaires intrahépatiques	32
III - L'Hépatite virale C	36
Histoire naturelle de l'Hépatite C	36
Recrutement de cellules T non-spécifiques pendant cHC	37
Fibrose	37
Caractéristiques moléculaires du VHC	38
Cycle cellulaire du VHC	38
Réponse immunitaire contre le VHC :	40
Réponse spécifique et résolution	40
Réponse spécifique et chronicité	41
Lymphocytes T non-classiques	43
Lymphocytes T $\gamma\delta$	43
La réponse lymphocytaire B	44
Réponse immunitaire innée	45
Interférons de type I	45
La réponse NK	46
Traitement de l'hépatite virale C	47
MATERIELS ET METHODES	56
Patients et individus contrôles	56
Informations sur les paramètres cliniques de la maladie	56
Isolement des cellules mononuclées périphériques.	57
Extraction des lymphocytes intrahépatiques	57
Expansion <i>in vitro</i> des cellules isolées à partir des patients	58
Immunomarquages et cytométrie de flux.	58
Principaux anticorps monoclonaux utilisés	59
Populations cellulaires étudiées	60
Multimères de complexes peptide VHC:HLA classe I.	60
Détection de cellules ayant engagé un programme de mort cellulaire.	60
Dosage de cytokines par ELISA	61
Extraction des ARN totaux et synthèse des ADN complémentaires (ADNc).	61
Analyse du répertoire des récepteurs KIR par réaction de PCR	61
Séquence des oligonucléotides utilisés pour l'analyse du répertoire des récepteurs KIR.	62

Analyses statistiques	62
RESULTATS	64
Article 1	64
“Features and Distribution of CD8 T cells with HLA Class I Specific Receptor Expression in Chronic Hepatitis C.”	
Article 2	66
“Altered Distribution of Natural Killer Cell Subsets in Patients with Chronic Hepatitis C.”	
Article 3	68
“Characteristics and Subset Composition of CD8+ Natural Killer (NK) Cells in Patients with Chronic Hepatitis C.”	
Résultats sur l’Etude du répertoire des récepteurs KIR de patients atteints d’hépatite virale C chronique.	70
Introduction	71
Présentation et discussion des résultats actuels	72
Conclusions provisoires	74
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	81
Les cellules T CD8+NKR+ au cours de l’hépatite virale C chronique.	81
Les modifications phénotypiques des cellules T CD8+NKR+ au cours de l’hépatite virale C chronique.	82
Les cellules T CD8+ infiltrant le foie au cours de l’infection VHC chronique.	83
Un rôle pour les cellules NK-CTL dans les lésions hépatiques au cours de l’hépatite virale C chronique ?	84
Les Cellules NK des patients infectés par le VHC.	86
Conclusion.	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	92

ABBREVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
Ag :	antigène
ALAT :	alanine amino transférase
ARN :	acide ribonucléique
BCR :	B cell receptor
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CDR :	complementarity determining region
CMV:	cytomegalovirus
CPA :	cellules présentatrices d'antigènes
CTL :	cytotoxic T lymphocytes
DC :	cellules dendritiques
EBV :	virus d'Epstein-Barr
HVR :	hyper variable region
HLA :	human leucocyte antigen
HSC:	hepatic stellate cells
IL :	interleukine
Ig :	immunoglobuline
IFN:	interféron
ITI(A)M :	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory (activating) motif
KIR :	killer immunoglobulin-like receptor
LIH :	lymphocytes intra-hépatiques
LILR:	leukocyte Immunoglobulin-like receptors
LRC:	leukocyte receptor complex
LSEC :	liver sinusoidal endothelial cell
MET. A/F:	Metavir score activity/fibrosis
MIC :	MHC I-related chain
NCR :	natural cytotoxicity receptors
NK :	cellule natural killer
NKR :	NK cell receptor
NK-T :	natural killer T lymphocytes
NS :	protéine non structurale
PBMC :	peripheral blood mononuclear cells
PCR :	polymerase chain reaction
PRR:	pattern recognition receptors
RT :	reverse transcription
SHP:	SH2-containing protein tyrosine phosphatase
SHIP:	SH2-containing inositol polyphosphate5- phosphatase
TCR :	T cell receptor
TGF :	transforming growth factor
Th :	T helper lymphocyte
TLR:	Toll-like receptor
TNF :	tumor necrosis factor
TRAIL:	TNF-related apoptosis inducing ligand
VHB :	virus de l'hépatite B
VHC :	virus de l'hépatite C
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine

Objectifs

Objectifs du travail

Les lésions histologiques du foie au cours de l'hépatite virale C chronique s'accompagnent d'une importante infiltration lymphocytaire portale, de phénomènes de nécrose focale et de lésions dégénératives lobulaires. Parmi ces lymphocytes, les lymphocytes T CD8⁺ sont abondants dans le lobule et les zones péri-portales et leur potentiel cytotoxique semble contribuer significativement à la lyse hépatocytaire de façon spécifique et non spécifique chez les patients.

Pendant ces dix dernières années, beaucoup de travaux ont décrit l'expression par les lymphocytes T CD8⁺ conventionnels, de récepteurs classiquement exprimés par les cellules NK. Cette expression est observée sur les cellules T CD8⁺ à un stade activé/mémoire. Parmi ces récepteurs, beaucoup sont des ligands de molécules HLA de classe I classiques ou non classiques. Comme dans le cas des cellules NK, l'interaction productive de ces récepteurs avec leurs ligands peut influencer significativement les propriétés biologiques des lymphocytes T CD8⁺ classiques. Ainsi, ils peuvent moduler les fonctions effectrices (donc l'activité cytolytique) et influencer la résistance à la mort cellulaire associée à l'activation. Par conséquent, ils pourraient promouvoir un certain niveau d'accumulation de cellules T CD8⁺ comme cela a été observé dans un modèle de souris doublement transgéniques. Il a ainsi été suggéré qu'un contexte d'infection chronique pourrait favoriser l'accumulation de cellules T CD8⁺ différenciées et exprimant des NKRs.

Pour ces raisons, l'expression de ces récepteurs par les cellules T CD8⁺ pourrait par exemple à la fois, altérer la capacité de réponse des cellules spécifiques du VHC et aussi favoriser la persistance dans le foie malade, des cellules T CD8⁺ au sens large. Les hépatocytes seraient ainsi d'avantage exposés à ces cellules et à leur potentiel cytotoxique avec pour conséquence directe, des possibilités accrues de lyse. Puisque les cellules T CD8⁺ des patients atteints d'hépatite virale C chronique n'ont pas (ou peu) été étudiées de ce point de vue, nous avons voulu examiner l'expression de certains récepteurs de molécules HLA de classe I par les cellules T CD8⁺ classiques chez les patients et rechercher de possibles liens entre la fréquence de ces cellules et les paramètres cliniques de la maladie.

Parce que les récepteurs de molécules HLA de classe I régulent la biologie des cellules

NK et puisque c'est une caractéristique du VHC d'interférer avec la réponse NK par de multiples mécanismes (voir l'introduction), un autre objectif de ce travail était de caractériser le compartiment des cellules NK des patients par sous-types cellulaires définis au moyens de l'expression de ces récepteurs. Nous avons ainsi cherché à décrire le phénotype général de ces sous-populations et à examiner leur distribution dans le foie et la périphérie des patients. Par ailleurs, une étude complète à été consacrée à la fraction importante de cellules NK, qui chez l'homme, expriment le récepteur CD8. D'une part, il n'existait pas de données sur cette population de cellules NK chez les patients VHC+ chroniques et d'autres part, des études suggèrent que cette population possède un potentiel cytolytique augmenté par rapport à celui des autres cellules NK. Etant donné que le VHC n'est pas cytopathogène et que le système immunitaire lui même semble responsable de la majorité des dommages cellulaires, nous avons jugé important d'examiner dans le détail les caractéristiques de la population NK CD8+ dans le sang et le foie des patients.

Enfin, nous avons souhaité examiner le répertoire des gènes de certains de ces récepteurs de molécules HLA de classe I classiques (le groupe des KIRs) chez les patients et le comparer à celui d'une cohorte d'individus sains pour rechercher d'éventuels liens entre ce répertoire et l'évolution vers la chronicité comme cela a été décrit dans d'autres situations pathologiques.

Introduction

I – La réponse immunitaire

La fonction première du système immunitaire est la défense de l'organisme contre des éléments reconnus comme étranger et potentiellement pathogènes. Chez les animaux vertébrés supérieurs, on distingue l'immunité innée et l'immunité spécifique. L'immunité innée est capable de réaction rapide et est source de signaux pour le développement de réponses spécifiques adaptées. Les réponses spécifiques sont plus lentes mais permettent la mise en place de la mémoire immunitaire qui aide les organismes à répondre plus rapidement et plus efficacement à une agression microbienne renouvelée.

L'immunité innée repose sur plusieurs principes de base avec en premier lieu la détection des microorganismes au moyen de la reconnaissance de motifs moléculaires présents chez de nombreuses familles de ces microbes et absents des organismes hôtes. Par exemple, la détection d'ARN double brin signale la présence de virus au sein de l'organisme et la détection de lipopolysaccharides signale la présence de bactéries de type gram négative. Ce type de reconnaissance met en jeu des récepteurs très conservés qui ne sont pas exprimés de façon clonale et dont l'expression ne dépend pas de phénomènes de recombinaison de gènes. Ces récepteurs rassemblés sous le terme de « Pattern Recognition Receptors » (PRR) peuvent être solubles, membranaires ou intracellulaires. Parallèlement, le système immunitaire innée est aussi capable de réagir à l'absence de molécules du soi. Ainsi l'absence de molécules normalement présentes sur les cellules et capables de freiner l'activation du complément va rendre les microbes dépourvus de telles molécules sensible aux attaques du complément. Par ailleurs, les cellules infectées par des virus qui réduisent l'expression de surface des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (HLA chez l'homme) pour échapper aux réponses spécifiques, sont détectables par les lymphocytes Natural Killer (NK) qui réagissent à ces modifications du soi en s'activant et en détruisant les cellules infectées. Enfin l'immunité innée peut également réagir à l'apparition sur les cellules infectées de molécules normalement non exprimées. Par exemple les cellules NK peuvent s'activer après reconnaissance des molécules nouvellement exprimées à la surface de cellules épithéliales infectées. On parle alors de reconnaissance du « soi altéré ».

L'immunité adaptative repose sur des lymphocytes B qui produisent des anticorps et des lymphocytes T qui sont cytotoxiques et/ou produisent des cytokines. Ces lymphocytes ont en commun de se différencier dans des organes lymphoïdes centraux et de les quitter munis de récepteurs capables de reconnaître presque n'importe quel antigène. Dans la très grande majorité des cas, ces récepteurs d'antigènes (BCR et TCR) suivent une distribution dite

clonale; chaque lymphocyte exprime un seul BCR ou TCR à sa surface. La présence d'un antigène dans l'organisme va conduire à l'activation des quelques lymphocytes porteurs de récepteurs capables de le reconnaître, à l'expansion de ces lymphocytes et à leur différenciation en cellules effectrices B ou T. Ces événements sont décrits sous le terme de sélection clonale. Le BCR reconnaît les antigènes sous leur forme natives. En revanche, le TCR reconnaît le plus souvent les antigènes sous la forme de fragments peptidiques court présentés associés aux molécules du CMH (on parle de restriction de la reconnaissance T par les molécules du CMH) à la surface de cellules spécialisées dans la présentation des antigènes (CPA) et dont les cellules dendritiques sont le meilleur exemple. Le répertoire des protéines constituant le BCR et le TCR est généré par recombinaison de régions d'ADN, ce qui permet une très grande diversité. Ces récepteur sont par eux même incapables de déterminer si un antigène qu'ils peuvent reconnaître appartient à l'hôte ou bien à un microbe. Cette distinction est possible grâce à une information appelée second signal qui est fournie par l'immunité innée. Par exemple, en réponse à la détection de virus dans l'organisme les cellules dendritiques surexpriment certaines molécules dites de costimulation, et la reconnaissance simultanée du complexe peptide antigénique:HLA par le TCR et des molécules de costimulation par des récepteurs spécialisés va permettre l'activation des lymphocytes T. La reconnaissance d'antigènes en l'absence de signaux de costimulation ne permet pas l'activation des lymphocytes et dans certaines situations, peut conduire à un état d'inactivation. Plusieurs éléments du système immunitaire sont présentés plus en détails ci après.

Généralités sur les cellules du système immunitaire

Les différentes cellules du système immunitaire dérivent toutes de cellules souches hématopoïétiques multipotentes générées par le foie fœtal puis par la moelle osseuse après la naissance. Ces cellules sont à l'origine des progéniteurs des cellules lymphoïdes dont sont issues par exemple les lymphocytes Natural Killer (NK), les lymphocytes classiques B et T ainsi que des lymphocytes dits non classiques tels que les cellules NK-T. Les cellules souches sont aussi à l'origine des progéniteurs des cellules myéloïdes dont dérivent les monocytes/macrophages, les polynucléaires, les cellules dendritiques d'origine myéloïde, les plaquettes et les hématies. La différenciation des précurseurs des lymphocytes T et B se fait dans des organes spécialisés appelés organes lymphoïdes primaires dont le microenvironnement cellulaire spécialisé (stroma) assure la présence de facteurs solubles et d'interactions cellulaires nécessaires à une bonne différenciation efficace. Les précurseurs des

lymphocytes T et B colonisent le thymus et la moelle osseuse respectivement, se différencient en lymphocytes murs puis quittent ces organes pour rejoindre la circulation sanguine et, par les vaisseaux lymphatiques afférents, coloniser les zones dites T et B des organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions lymphatiques, la rate, et les zones lymphoïdes associées à certains tissus qui sont des sites d'entrée privilégiés pour les microorganismes (par exemple les plaques de Peyer de l'intestin). C'est dans ces organes secondaires que sera déclenchée la réponse immunitaire spécifique contre les antigènes de microorganismes infectieux.

Les macrophages et polynucléaires

Les macrophages se différencient à partir des monocytes. Ils sont présents dans de nombreux organes. Ils sont riches en lysosomes contenant des hydrolases et des peroxidases qui participent à la destruction des microorganismes phagocytés. Ils phagocytent les agents infectieux à la suite de l'engagement de PRR, de récepteurs Fc ou de récepteurs aux fragments du complément. Ils sont sources de cytokines proinflammatoires (interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6) et de chimiokines telle que l'IL-8. Tout comme les cellules dendritiques dont nous reparlerons plus loin, ils peuvent aussi participer à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Pour ce qui nous concerne nous évoquerons occasionnellement la population des macrophages du foie (cellules de Kupffer). Quand aux polynucléaires, ils comprennent les neutrophiles qui sont phagocytiques et sécrètent de grandes quantités de chimiokines, les éosinophiles qui sont importants pour les réponses antiparasitaires et l'allergie et les basophiles qui interviennent aussi dans l'allergie. Ils ne seront pas davantage évoqués dans ce travail.

Apprêtement et présentation des antigènes par les cellules présentatrices

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (système HLA "Human Leucocyte Antigen" chez l'homme) codent pour des molécules polymorphes qui sont exprimées sur toutes les cellules de l'organisme. Les molécules du CMH de classe I (HLA A, B, et C) et de classe II (HLA DP, DQ, DR) sont des glycoprotéines membranaires formées de l'association d'une chaîne α et de la β 2-microglobuline pour le CMH I, et d'un hétérodimère de chaînes α et β pour le CMH II. Les molécules CMH I sont exprimées par toutes les cellules nucléées, tandis que les molécules CMH II ne sont présentes que sur certains types cellulaires parmi lesquels les cellules présentatrices d'antigènes spécialisées (CPA) comme

les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B mais aussi les cellules épithéliales thymiques, certaines cellules endothéliales et les lymphocytes T activés chez l'homme (Klein et al., 2000a; Klein et al., 2000b). Comme indiqué ci dessus, les molécules CMH I présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8+, alors que les complexes peptide:CMH II sont reconnus par les lymphocytes T CD4+ (Cresswell, 1994; Pamer et al., 1998). Il existe aussi des molécules CMH I dites non classiques telles que les molécules CD1 (Lantz et al., 1994; Maher et al., 1997; Porcelli, 1995) ou HLA-E. Ce sont des glycoprotéines non-polymorphiques exprimées sous la forme d'une chaîne α également associée à la β 2-microglobuline. Les molécules CD1 (CD1a, b, c et d) sont donc apparentées aux CMH I mais leur trafic intracellulaire à des ressemblances avec celui des molécules CMH II, elles sont surtout exprimées par les CPA, par des cellules épithéliales intestinales, des cellules de Langerhans et les hépatocytes (Balk et al., 1994; Canchis et al., 1993; Porcelli, 1995; Porcelli et al., 1999). Chez l'homme, les molécules CD1 présentent des antigènes lipidiques ou glycolipidiques à des lymphocytes T spécialisés $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$ (Faure et al., 1990; Porcelli et al., 1992; Ulrichs et al., 2000) et aux cellules T dites NK-T (Lantz et al., 1994; Porcelli et al., 1992; Tanaka et al., 1995). HLA-E est une molécules très peu polymorphe, exprimée par de nombreux type cellulaires et qui en situation normale, présente des peptides issus des séquences leaders des molécules HLA-A,B,C. Sa reconnaissance peut donc donner une information au système immunitaire sur la synthèse de molécules classique HLA I qui est souvent modifiée par les infections virales ou la transformation tumorale. Certain virus comme le cytomegalovirus (CMV) neutralisent ce système d'information en assurant la synthèse d'un peptide pouvant se lier à HLA-E. Nous reviendrons sur ces éléments dans les résultats et la discussion.

Apprêtement et présentation des antigènes

L'apprêtement des antigènes repose sur leur dégradation par des enzymes protéolytiques intracellulaires spécialisés. Les antigènes protéiques synthétisés par la cellule elle-même par exemple lors d'une infection virale, sont dégradés par le protéasome qui est un complexe enzymatique multicatalytique présent dans le cytosol (Klein et al., 2000a; Rock et al., 1999). Un système de moléculaire spécialisé (TAP1/2) (Transporter associated with antigen processing) assure le transport des peptides antigéniques produits vers le réticulum endoplasmique où, à l'issue de plusieurs étapes très contrôlées, ils s'associent aux molécules du CMH I nouvellement synthétisées sous la forme de peptides de 8-9 aminoacides. Les

complexes peptide:CMH I ainsi assemblés sont exprimés à la surface des cellules et peuvent être reconnu par les cellules T CD8+.

Les antigènes d'origine extracellulaire sont internalisés en phase fluide ou via des récepteurs (BCR, récepteurs du complément, récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines : FcR, récepteurs au mannose) (Klein et al., 2000a; Lanzavecchia, 1996). Ces antigènes sont ensuite dégradés par protéolyse dans des compartiments d'endocytoses acides et les peptides de 14 à 17 acides aminés générés s'associent aux molécules du CMH II grâce à l'aide de protéines spécialisées telles que HLA-DM. Les complexes peptide:CMH II sont ensuite dirigés vers la surface cellulaire ou ils sont susceptibles d'être reconnus par les lymphocytes T CD4⁺. Les cellules dendritiques et les macrophages peuvent aussi présenter les complexes peptide:CMH I aux lymphocytes T CD8⁺ par présentation croisée. Dans ce cas, des antigènes extracellulaires sont transférés des compartiments d'endocytose vers le cytosol où ils sont pris en charge par la voie de présentation des antigènes intracellulaires (Kovacsovics-Bankowski et al., 1995).

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) représente moins de 1% des cellules mononuclées circulantes mais elles sont présentes dans tout l'organisme sous différentes formes. Elles sont particulièrement abondantes dans la peau et les muqueuses en contact avec le milieu extérieur. Par exemple la sécrétion de chimiokine CCL20 par les kératinocytes cause l'attraction de précurseurs de DC qui s'établissent et forment les populations de cellules de Langherans de l'épiderme. Par leur capacité d'endocytose, de phagocytose ou de macropinocytose, les DC assurent la fonction de sentinelle au sein des tissus qu'elle colonisent.

Suite à la détection de molécules d'origine microbiennes, les DC ont la capacité de freiner leur potentiel d'internalisation et d'engager un programme de maturation phénotypique et fonctionnelle qui leur confèrent des capacités uniques à migrer de leur site de surveillance vers les organes lymphoïdes (perte de CCR6, acquisition de CCR7), à produire certaines cytokines et chimiokines (en particulier l'IL-12) et à activer de façon efficace les lymphocytes T naïfs (induction des signaux de costimulation CD80, CD86, CD40, augmentation d'expression des molécules CMH) dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires (Banchereau et al., 2000). L'IL-12 produite par les DC matures va promouvoir la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T effecteurs Th1, de stimuler la production d'IFN- γ par les cellules NK et de potentialiser l'activité cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ (Banchereau et al., 2000; Macatonia et al., 1995; Orange et al., 1996;

Trinchieri, 1995; Vieira et al., 2000). En l'absence d'IL-12 (dont la production est inhibée par l'IL-10), les lymphocytes T CD4⁺ se différencient plutôt en effecteurs Th2 (Caux et al., 1994a). En l'absence d'infection, les DC peuvent aussi assurer des fonctions d'induction de tolérance en présentant des peptides du soi dans un contexte dépourvu de signaux de costimulation et de sécrétion de cytokines.

Les lymphocytes B

Ces lymphocytes se différencient dans la moelle osseuse au cours d'une succession d'étapes identifiables par l'expression de molécules de surface et par le statut du réarrangement des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (configuration germinale ou réarrangée). Au stade dit B mature, les lymphocytes expriment un récepteur de l'antigène membranaire (IgM), ils quittent la moelle pour les follicules des organes lymphoïdes secondaires riches en cellules dendritiques folliculaires. Phénotypiquement, ils sont alors IgM⁺IgD⁺ et se distinguent entre autre par l'expression des molécules CD19, CD20, CD21, CD32, CD40 et de molécule du CMH de classe II. Les lymphocytes B sont impliqués dans la composante humorale de la réponse immunitaire par la sécrétion d'anticorps (ou immunoglobulines) spécifiques qui diffusent dans l'organisme et se lient à l'antigène qui a induit l'activation du/des clones B correspondants. Cette activation se fait à la frontière des zones T/B des follicules et est facilité le plus souvent par les lymphocytes T activés via l'interaction CD40-CD40 ligand. Lors de telles interactions, les cellules B sont aussi des cellules présentatrices de l'antigène aux cellules T CD4⁺ car elles expriment les molécules CMH de classe II. Les cellules B activées donnent naissance aux centres germinatifs où se déroulent l'expansion clonale, les hypermutations dans les régions variables qui influence l'affinité des anticorps, les commutations de classe générant des IgG, IgA ou IgE (influencées par l'environnement cytokinique) et la différenciation en lymphocytes sécréteurs d'anticorps (plasmocytes) ou mémoires. Dans le cas d'infections virales, les anticorps sécrétés peuvent permettre la neutralisation des virions en inhibant leur entrée dans les cellules cibles et en participant à l'élimination de particules libres par le système du complément et les phagocytes (Burton et al., 2000; Cooper et al., 1983). Les anticorps efficaces contre les virus sont souvent dirigés contre les protéines d'enveloppe car ils bloquent l'interaction avec la molécule récepteur sur les cellules de l'hôte. La détection de tels anticorps est utilisé dans les tests sérologiques de diagnostic.

Les lymphocytes T, développement et physiologie

Le développement des lymphocytes T

Ces lymphocytes se différencient à partir de précurseurs qui colonisent le thymus et engagent de multiples interactions avec les cellules épithéliales des zones corticale puis médullaire. Les phases les plus précoces correspondent à des événements de réarrangement génique qui vont permettre l'expression membranaire du récepteur de l'antigène (ou TCR) associé à un complexe de chaînes (CD3 γ , δ , ϵ , ζ et η) (Ohashi et al., 1985; Yague et al., 1985) importantes pour la transmission de signaux lors de l'engagement du TCR. Chaque chaîne du complexe CD3 comprend un/des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation motif). L'engagement du TCR induit la phosphorylation de résidus tyrosine des ITAM permettant ainsi la transduction du signal (Malissen et al., 1993; Samelson et al., 1987; Weiss, 1993). Le TCR correspond à un hétérodimère formé des protéines α et β ou γ et δ unies par un pont disulfure. Tout comme les gènes des chaînes des Ig, les gènes des chaînes TCR sont morcelés. Le locus TCRA (chromosome 14) contient les gènes pour les chaînes α et δ tandis que les loci TCRB et TCRG (chromosome 7) contiennent les gènes des chaînes β et γ . Chaque chaîne comprend un domaine constant (C) et un domaine variable (V) entre lesquels s'intercale un domaine de jonction (J) et parfois un domaine de diversité (D) (Born et al., 1985). Par contre, une fois réarrangés, les gènes des chaînes TCR ne subissent pas de mutation somatique lors de l'activation par l'antigène. Cette recombinaison dite V(D)J est catalysée par un complexe enzymatique composé des protéines RAG (Recombinaison Activating Genes)-1 et 2 et de protéines intervenant dans la réparation de l'ADN (Gennery et al., 2000). Les enzymes RAG ciblent des séquences dites signal de recombinaison (RSS) qui flanquent les segments V, D et J, et catalysent la coupure entre les RSS et les régions codantes. La ligation des segments DJ puis V-DJ permet d'éliminer la portion d'ADN comprise entre ces segments et de générer la séquence codante de la région V(D)J. La diversité du répertoire TCR est très grande car en plus de la diversité générée par la recombinaison de certains segments parmi plusieurs possibles, il existe une diversité supplémentaire liée à l'addition et/ou au retrait de nucléotides lors de l'assemblage des segments V(D)J (diversité jonctionnelle) (Ramsden et al., 1997a). Comme dans le cas des Ig, la zone d'interaction de chaque chaîne du TCR avec l'antigène met en jeu des boucles dites CDR (complementary determining regions). Tandis que les CDR1 et 2 correspondent à des segments des domaines V, la boucle CDR3 correspond à la région de jonction et est très variable. Comme indiqué précédemment, le TCR des cellules T classiques ne reconnaît pas

directement un antigène mais plutôt un court segment peptidique de ce dernier associé aux molécules du CMH de classe I (lymphocytes T CD8+) ou II (lymphocytes T CD4+). La diversité du répertoire TCR des lymphocytes T $\gamma\delta$ est plus limitée que celles des lymphocytes T $\alpha\beta$ classiques.

Lorsque les thymocytes immatures expriment un TCR (stade CD4CD8 double positif), ils sont soumis à des événements dits de sélection positive et négative (Zuniga-Pflucker 2004).. Parce que le répertoire TCR est généré de façon aléatoire, il contient des TCR qui ne sont pas adaptés à une bonne interaction avec les molécules CMH. Ces cellules T immatures sont éliminées par défaut car elles ne reçoivent de signal de survie délivré par interaction du TCR avec des complexes peptides du soi:molécules CMH en surface de l'épithélium cortical thymique. Lorsque l'interaction est possible mais modérée, les cellules reçoivent un signal anti-apoptotique et la différenciation se poursuit, les thymocytes deviennent alors des cellules T CD4+CD8- ou CD4-CD8+. Les thymocytes immatures CD4+CD8+ peuvent aussi exprimer des TCR capables de reconnaître avec une forte affinité, des peptides de l'hôte associés aux molécules CMH (thymocytes autoréactifs sources possible de réponses auto-immunes). Dans leur grande majorité, ces thymocytes sont éliminés physiquement (délétion) par induction de mort cellulaire lors de l'interaction avec les complexes peptides du soi:CMH exprimés sur les cellules dendritiques présentes au niveau de la jonction cortex-médulla et dans la médulla (Zuniga-Pflucker 2004). D'autres cellules T avec des TCR ayant une affinité modérée pour des peptides du soi ne sont pas éliminées et peuvent gagner la périphérie ou elles exercent une influence suppressive vis à vis d'autres cellules T capables de réponse au soi. Les cellules CD4+CD25+Foxp3+ dite régulatrices sont l'exemple le mieux connu de ces cellules.

Les lymphocytes T périphériques

Les lymphocytes T murs qui quittent le thymus sont dits naïfs. Ils expriment les molécules TCR, CD2, CD3, CD5, CD28, CD45RA et CD4 ou CD8. CD4 et CD8 sont les corécepteurs participant à l'interaction avec le complexe peptide antigénique:molécules CMH, lors de la reconnaissance de l'antigène et contribuant à l'activation via le recrutement d'une tyrosine kinase (p56lck). Les lymphocytes T $\alpha\beta$ classiques expriment CD8 sous la forme d'un hétérodimère $\alpha\beta$ tandis que d'autres populations T ont un homodimère CD8 $\alpha\alpha$. Les cellules T regroupent plusieurs types qui se distinguent fonctionnellement. Les lymphocytes T CD8+ qui, après activation, se différencient en cellules cytotoxiques (ou CTL) détruisent directement les cellules transformées ou infectées porteuses de l'antigène cible et

peuvent, au travers de la sécrétion d'Interféron (IFN)- γ et de Tumor Necrosis Factor (TNF)- α activer les macrophages et inhiber la réplication virale (Guidotti 2001). Les lymphocytes T auxiliaires (ou helper) peuvent sécréter des cytokines de différent types avec des conséquences fonctionnelles distinctes sur lesquelles nous reviendrons (**Figure 1**). Enfin, les lymphocytes T suppresseurs/ou régulateurs évoqués plus haut semblent contrôler certaines réponses immunitaires au moyen de médiateurs solubles qu'ils peuvent sécréter tels que l'IL-10 ou le transforming growth factor (TGF)- β . Dans certaines infections, plusieurs peptides antigéniques peuvent être reconnus par les lymphocytes T, conduisant à l'apparition de différents clones (réponse polyclonale ou multi-spécifique). Dans d'autres cas, le nombre de peptides antigéniques reconnu est très limité et conduit à une réponse de type oligoclonale. Si un seul peptide est reconnu (immunodominance), la réponse T sera quasi clonale. La détection des cellules T spécifiques permet de mieux comprendre l'évolution de la réponse immune spécifique au cours d'une l'infection virale. En pratique, la détection des lymphocytes T spécifiques d'un antigène peptidique donné est souvent évaluée par la capacité de réponse proliférative spécifique, la capacité à lyser spécifiquement des cibles porteuses de l'antigène, la sécrétion de cytokines déterminée par immunomarquage intracellulaire et cytométrie de flux ou par ELISPOT (Enzyme-Linked Immuno-SPOT) et plus récemment, par immunomarquage au moyen de complexes multimériques recombinants peptide:molécules CMH. Dans le cas de l'hépatite virale C cette approche a permis d'estimer la fréquence des CTL spécifiques de plusieurs peptides du virus lors de la phase aiguë ou chronique de l'infection (He et al., 1999; Lechner et al., 2000a; Sobao et al., 2001).

Polarisation de la réponse lymphocytaire T CD4+

Comme nous l'avons déjà évoqué, les lymphocytes T CD4+ activés peuvent se différencier en deux populations effectrices majeures aux fonctions distinctes. Les effecteurs T CD4+ polarisés Th1 secrètent d'importantes quantités d'IFN- γ et d'IL-2 alors que les Th2 produisent de l'IL-4, -5, -10 et -13 (Mosmann et al., 1989). Les Th1 sont impliqués dans la réponse immune à médiation cellulaire, efficace contre les pathogènes intracellulaires, et favorisent l'activité cytotoxique et l'expansion des CTL. Les Th2 favorisent, eux, la réponse immune à médiation humorale efficace contre les pathogènes extracellulaires, en activant la production d'anticorps par les lymphocytes B et en participant au recrutement des éosinophiles (Abbas et al., 1996; O'Garra, 1998). Cette dichotomie, initialement mise en évidence *in vitro*, est critique *in vivo* car l'efficacité de la réponse immunitaire spécifique

nécessite que la réponse soit adaptée à la nature de l'agent infectieux. Par exemple, au cours d'une infection virale, le contrôle de l'équilibre Th1/Th2 est essentiel pour assurer le contrôle de la réplication du virus tout en minimisant les dommages causés par les effecteurs au tissu infecté. La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en effecteurs Th1 ou Th2 est fortement influencée par les cytokines présentes lors de l'activation qui sont elles mêmes influencées par les cytokines présentes lors de l'activation des DC. Ainsi, au cours d'infections virales, la production d'IFN de type I (IFN- α/β), d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-12 sur le site inflammatoire conduira à de fortes productions d'IL-12 par les DC matures (Trinchieri, 1995; Vieira et al., 2000). Cette réponse immune de type Th1, permettant la lyse des cellules infectées, est particulièrement efficace dans l'éradication des virus. La production d'IL-10 au cours de l'infection virale peut inhiber la sécrétion d'IL-12 favorisant plutôt une réponse de type Th2.

L'activité des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL)

Après activation, les cellules T CD8⁺ prolifèrent et se différencient en cellules cytotoxiques capable, après engagement du TCR, de lyser des cellules cibles par la sécrétion de molécules effectrices (perforine et granzymes A et B) ou par induction de mort cellulaire par la voie Fas/FasL ou TNF/TNF-R (Stenger et al., 1998). Les CTL produisent aussi des cytokines et une distinction parmi les CTL (Tc1 versus Tc2) a été proposée (Maggi et al., 1994; Salgame et al., 1991; Vukmanovic-Stejić et al., 2000). Les Tc1 correspondraient aux cellules produisant de l'IFN- γ et du TNF- α en présence d'IL-12 tandis que les cellules pouvant sécréter de l'IL-4 en présence d'IL-4 correspondraient aux Tc2. Lors des infections virales, l'efficacité de l'activité cytotoxique des CTL joue un rôle central dans l'éradication du virus puisqu'elle assure l'élimination physique des cellules infectées. Dans le cas d'infection par le VIH par exemple, une forte réponse cytotoxique contre différents antigènes viraux constituerait un bon pronostic (Dalod et al., 1999; Ogg et al., 1998). Comme nous le verrons plus loin, il semble qu'une réponse cytotoxique forte et multispécifique est associée à l'éradication du VHC lors de la phase aiguë de l'hépatite virale C, (He et al., 1999; Lechner et al., 2000a; Maini et al., 2000). En revanche, une activité cytotoxique insuffisante des CTL pourrait ne pas permettre l'élimination du virus tout en contribuant à la destruction du tissu hépatique qui caractérise l'hépatite C chronique (Cerny et al., 1999; Chang et al., 1997; Chisari et al., 1997). Enfin, la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les CTL peut aussi jouer un rôle dans l'élimination des cellules infectées. Ce mécanisme antiviral non cytolytique a été

mis en évidence dans des modèles d'infection par le virus de l'hépatite B, chez la souris et le chimpanzé (Guidotti et al., 1996a; Guidotti et al., 2001; Guidotti et al., 1996b).

Les lymphocytes T NK (NK-T)

Les lymphocytes NK-T ont aussi une origine thymique. Ils expriment en plus du récepteur de l'antigène des lymphocytes T classique (complexe TCR/CD3) des molécules trouvés sur les cellules NK comme CD56 ou NKR1 (Mingari et al., 1995; Ortaldo et al., 1991). Les cellules NK-T sont essentiellement présents dans le foie et la moelle osseuse (Crispe et al., 1996; Doherty et al., 1999; Nagasaka et al., 1996; Norris et al., 1998). Leur TCR est dit semi invariant car la chaîne alpha est invariante et la chaîne beta n'utilise qu'un nombre limité de segments variables. Les cellules NK-T reconnaissent des antigènes lipidiques ou glycolipidiques associés aux molécules CD1d et pourraient exercer une activité cytotoxique sur les cellules infectées (Lantz et al., 1994; Maher et al., 1997). Après activation, les cellules NK-T produisent très rapidement de grandes quantités de cytokines comme l'IL-4 mais aussi d'IFN- γ et de TNF- α selon le contexte (Doherty et al., 1999; Nuti et al., 1998). Ces cellules pourraient ainsi avoir un rôle dans la régulation de la réponse antivirale au niveau du tissu hépatique.

Les cellules tueuses naturelles ou Natural Killers (NK)

Les cellules NK font partie des premières lignes de défense de l'organisme contre des infections virales et des processus de transformation cancéreuse (Biron et al., 1999) (**Figure 2**). Les cellules NK sont identifiées phénotypiquement par l'absence de CD3 et la présence de CD56 et/ou de CD16 (Fc γ RIII) (Vely et al., 1996). Chez l'homme les cellules NK représentent entre 10 et 15% de la population totale de lymphocytes. Elles sont aussi retrouvées dans les tissus, tels que les poumons et le foie (Trinchieri, G., 1989). Les lymphocytes NK appartiennent au système immunitaire innée car ils peuvent réagir très rapidement à une infection sans phase de sensibilisation, ils expriment des récepteurs non dépendant de réarrangements de gènes et ne conduisent pas à la génération de mémoire immunitaire. Ils expriment des PRR dont des TLRs (Toll Like Receptors)(Akira 2006, Medzhitov R. 2001). Ainsi le TLR-2 des cellules NK est capable de se lier à des constituants de bactéries ou de parasites et d'induire la production d'IFN- γ et de TNF- α . Le TLR-5 détecte la flageline d'*E. coli*. Les cellules NK peuvent aussi s'activer à travers le TLR-3 qui détecte les ARN double brin (**Figure 2**) ou du TLR-9, qui reconnaît des motifs non-méthylés de l'ADN microbien (Sivori 2004, Becker 2003, Schmidt 2004, Pisegna et al 2004). Les

TLR-7 et -8, qui reconnaissent de l'ARN viral simple brin (Heil et al., 2004, Lund et al 2004) sont aussi présents chez les cellules NK (Hart et al., 2005). Les cellules NK expriment d'une manière constitutive, plusieurs récepteurs de cytokines et sont capables de produire rapidement de l'IFN- γ et d'autres cytokines en réponse à des cytokines (Carson, et al., 1994, Fehniger, et al., 1999, Aste-Amezaga, et al., 1994). Les IFN- α/β peuvent induire l'activité cytolytique des cellules NK (Biron et al., 1999; Kaser et al., 1999). Enfin, les cellules NK peuvent influencer la réponse immunitaire adaptative au travers de la production de cytokines (mais pas de l'IL-2) et au travers d'interactions directes avec les cellules dendritiques (Cooper et al., 2004, Degli-Esposti 2005, Moretta 2002, Zitvogel, L 2002). L'activité cytotoxique des NK est régulée par l'intégration de multiples signaux activateurs et inhibiteurs (**Figure 3**) délivrés lors de l'engagement de multiples récepteurs appelés respectivement activateurs et inhibiteurs (Leibson 1997, Lanier 2001). Nous allons revenir sur ces récepteurs en nous limitant aux cellules NK humaines.

Le développement des cellules NK humaines

Les cellules NK se développent dans le microenvironnement de la moelle osseuse à partir d'un progéniteur lymphoïde (Colucci et al., 2003). Elles gagnent ensuite la circulation sanguine et certains organes dont le foie (Morris et al., 2004). Pendant leur développement, les cellules NK nécessitent la présence des facteurs c-kit et Flt-3 et de l'IL-15 (Perussia et al., 2005, Mrozek, E. et al., 1996 ; Yu, H. et al., 1998).

Sous populations de cellules NK chez l'homme

La plupart (90%) des cellules NK humaines expriment un faible niveau de la molécule CD56 (CD56^{dim}) et expriment des niveaux importants du Fc γ RIII (CD16), tandis que le reste de NK (10%) expriment sont CD56^{bright}CD16^{dim} ou CD56^{bright} CD16- (**Figure 4**). De faibles pourcentages de cellules sont CD56-CD16+ et semblent s'expandre chez des patients VIH+ (Mavilio, et al., 2005). La population CD56^{bright} serait le principal producteur de cytokines, telles que l'IFN- γ , l'IL-10, l'IL-13 et le granulocyte-colony stimulating factor (GM-CSF) et de chimiokines. Au contraire, les cellules NK CD56^{dim} produisent des quantités moindres de ces cytokines lorsqu'elles sont stimulées *in vitro*. (Cooper 2001). Les cellules NK humaines produisent aussi du TGF- β (Gray 1994), de l'IL-3 (Cuturi 1989) et de l'IL-5 (Warren 1995).

La cytotoxicité des cellules NK

Les cellules NK peuvent tuer des cellules infectées ou transformées par plusieurs mécanismes dont la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) impliquant CD16, la voie perforine/granzymes et les voies passant par des récepteurs impliqués dans la mort cellulaire de la famille du TNF : Fas-L, TNF- α et TRAIL (Montel et al., 1995, Arase et al., 1995, Kashii et al., 1999). Au repos, les cellules NK CD56^{dim} sont plus cytotoxiques que les cellules NK CD56^{bright}. Ces cellules CD56^{dim} possèdent une activité ADCC plus importante que les NK CD56^{bright} dû à un plus fort niveau d'expression de CD16 (Nagler et al., 1989). Cependant, les cellules CD56^{bright} et CD56^{dim} peuvent atteindre des niveaux d'activité cytolytique similaires après activation avec l'IL-2 ou l'IL-12 *in vitro* (Caligiuri et al., 1990, Nagler et al., 1990, Robertson et al., 1992). Ceci est en accord avec le fait que les cellules NK CD56^{dim} et NK CD56^{bright} fraîchement isolées peuvent contenir des niveaux comparables de perforine (Konjevic et al., 1995). Le profil d'expression divergent de récepteurs activateurs ou inhibiteurs par les NK CD56^{dim} et CD56^{bright} pourrait aussi moduler leur potentiel cytotoxique. Dans plusieurs types d'infection virale, une faible activité cytotoxique des cellules NK vis à vis des cellules infectées semble être associée à la persistance virale (Corado et al., 1997; Joncas et al., 1989; Katz et al., 1987; Quinnan et al., 1982).

Récepteurs activateurs des cellules NK humaines

Les récepteurs dits de cytotoxicité naturelle (NCR) incluent Nkp30, Nkp44 et Nkp46 (Moretta et al., 2000 Immunol today Moretta et al., 1996; Moretta et al., 2000) (**Tableau I**). Ces NCRs semblent jouer un rôle important dans l'induction de cytotoxicité contre les cellules transformées (Moretta et al., 2001). Les NCR sont aussi capables de reconnaître l'hémagglutinine de l'influenza (Mandelboim et al., 2001, Arnon et al., 2001), ainsi que les cellules infectées par le virus de la vaccine (Chisholm 2006). Le récepteur Nkp30 semble capable d'induire la maturation des DC immatures à travers la production de TNF- α et d'INF- γ (Vitale 2005) et de participer à l'élimination de DC immatures (Ferlazzo 2002, Della Chiesa 2003).

Les killer-cell Immunoglobulin-like receptors (KIR) activateurs appartiennent à la super famille des Immunoglobulines. Ils ont deux ou trois domaines extracellulaire de type Ig (KIR2D ou KIR3D) (**Figure 5**). Leur région cytoplasmique est courte (Short) et utilisent les motifs ITAM des molécules DAP12 pour transmettre des signaux activateurs. Ces KIR activateurs reconnaissent des molécules HLA-A,B,C (**Tableau I**).

La molécule NKG2C est de type lectine et s'associe à CD94 pour former des complexes activateurs des cellules NK. CD94-NKG2C reconnaît HLA-E.

NKG2D est aussi un récepteur de type lectine mais il forme des homodimères et ne reconnaît pas HLA-E. Ce récepteur peut être exprimé non seulement par presque toutes les cellules NK mais aussi par certains lymphocytes T (Bauer et al., 1999). Chez l'homme, les ligands de NKG2D incluent les protéines MICA/B et ULBP (Cosman et al., 2001, Sutherland et al., 2001) qui sont induites pendant les infections virales, (Groh et al., 2001, Welte et al., 2003), les transformations malignes de cellules ou des situations de stress (Groh et al., 1998, Groh et al., 1999).

Corécepteurs présents sur les cellules NK

D'autres molécules activatrices exprimées par les cellules NK fonctionnent principalement comme corécepteurs (**Tableau I**) car le signal qu'ils vont délivrer dépend du coengagement d'autre récepteur activateur (Moretta et al., 2001). Parmi ces molécules figurent 2B4 et NTB-A qui peuvent activer ou inhiber la fonction cellulaire selon la présence ou l'absence d'une autre molécule dénommée SAP. Si SAP est présente 2B4 et NTB-A vont délivrer un signal d'activation. Par contre, dans l'absence de SAP, 2B4 et NTB-A vont plutôt inhiber les cellules NK (Parolini et al., 2000, Sivori et al., 2000, Bottino et al., 2001). 2B4 reconnaît CD48, qui peut être induit sur les cellules infectées par le virus d'Ebstein Bar (EBV) (Fisher 1991). Une déficience en 2B4 est associée avec un désordre immunitaire (le syndrome lymphoprolifératif lié au X), qui est caractérisé par une susceptibilité accrue à une infection par EBV. 2B4 joue donc un rôle dans la défense contre l'infection par EBV. (Parolini et al., 2000, Tangye et al., 2000)

Le fait que Nkp80 puisse induire l'activation de clones de cellules NK avec un phénotype NCR^{bright} a suggéré que comme 2B4, il fonctionne comme un corécepteur plutôt que comme un récepteur classique (Vitale et al., 2001). Concernant le co-récepteur CD59, sa fonctionnalité dépend aussi de l'engagement simultanée d'autres récepteurs tels que les NCRs. Des analyses ont mis en évidence son association physique avec les NCRs Nkp46 et Nkp30 (Marcenaro et al., 2003). Le ligand de CD59 n'est pas clairement identifié mais CD2 est un ligand potentiel (Naderi et al., 1999, Hahn et al., 1992). Une autre molécule appelée « DNAX accessory molecule-1 » (DNAM) peut reconnaître CD155 et accroître la cytotoxicité et la production de cytokines chez les cellules NK (Bottino et al., 2003, Shibuya et al., 1996).

Récepteurs inhibiteurs des cellules NK humaines

Les récepteurs inhibiteurs des fonction effectrices NK reconnaissent des molécules CMH de classe I classiques et non classiques (**Tableau II**). Comme les KIR, les leukocyte Immunoglobulin-like receptors (LIR/LILR/ILT/CD85) sont des molécules de la super famille des Ig tandis que récepteurs CD94/NKG2A-B sont apparentés aux lectines. Ces récepteurs possèdent dans leur domaines intracytoplasmiques des motifs particuliers dénommés « ITIM » (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) qui après phosphorylation, recrutent des tyrosine phosphatases (comme SHP-1 et SHP-2) capables d'inhiber les fonctions cellulaires.

Les KIR inhibiteurs ont deux ou trois domaines de type Ig (2/3 D) mais ont tous un long (Long) domaine cytoplasmique avec deux ITIM (**Figure 5**). Ces KIR reconnaissent différents allèles HLA I. En général, les KIR2D reconnaissent les résidus 77 et 80 du domaine $\alpha 1$ (Ser 77 et Asn 80 (HLA-C groupe 1) ou Asn 77 et Lys 80 (HLA-C groupe 2)) des molécules HLA-C tandis que les KIR3D reconnaissent HLA-A/B. Dans tous les cas étudiés, les KIR inhibiteurs présentent une affinité très supérieure pour leurs ligand par rapport aux KIR activateurs. Ainsi, KIR2DL1 lie HLA-C*0401 avec une bien meilleure affinité que KIR2DS1. KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent leur ligand avec des affinités différentes. Sur cette base, un modèle hiérarchique de leur potentiel inhibiteur a été proposé (**Figure 6**).

CD94-NKG2A reconnaît HLA-E qui, comme on l'a vu, présente normalement des peptides leader hydrophobiques de molécules HLA I. Les ITIM sont portés par la portion cytoplasmique de NKG2A qui est associée de façon non covalente à CD94 dont la présence est nécessaire pour l'expression en surface. NKG2B est un variant d'épissage de NKG2A. En terme d'affinité, l'interaction CD94-NKG2A:HLA-E est bien supérieure à l'interaction activateur CD94-NKG2C:HLA-E. La reconnaissance de HLA-E par CD94-NKG2A semble perdue lorsque celui-ci présente des peptides dérivés de la protéine de choc thermique hsp60. Cet effet pourrait contribuer à l'élimination de cellules stressées par les cellules NK.

LIR1/ILT2/CD85j est le prototype des LILR, il possède 4 domaines de type Ig et 4 ITIM dans son domaine cytoplasmique. A la différence d'autres récepteurs NK il se lie à presque toutes les molécules HLA I au niveau du domaine $\alpha 3$ et ce, avec une faible affinité. Il lie avec une bien meilleure affinité la molécule UL18 du CMV qui peut ainsi potentiellement interférer avec la réponse NK.

Expression de NKRs par les populations NK CD56^{dim} et NK CD56^{bright}

Les sous population de cellules NK définies par le niveau d'expression de CD56 (CD56^{dim} et CD56^{bright}) diffèrent par leur profil d'expression de récepteurs NK (**Figure 4**). Dans la population CD56^{bright} la proportion de cellules qui expriment les récepteurs KIRs ou ILT-2 est faible ou nulle et la majorité de cellules expriment un fort niveau de CD94/NKG2A. Une exception concerne KIR2DL4 qui est constitutivement exprimé sur ces cellules. En revanche, la fréquence de cellules NK CD56^{dim} qui expriment les KIRs ou ILT-2 est plus importante mais beaucoup expriment aussi CD94/NKG2A. Pour ces cellules, KIR2DL4 est exprimé seulement après activation. Le récepteur activateur NKG2D est exprimé sur les deux type de cellules NK, les CD56^{dim} et les CD56^{bright} (Bauer et al., 1999).

Génétique des récepteurs KIR.

Tandis que les gènes qui codent pour les récepteurs NK de type lectine se regroupent dans la région chromosomique 12p12-13 dénommée « complexe NK » (NKC) (Yokohama 2003). Les gènes qui codent pour les récepteurs NK de type Immunoglobuline sont situés dans la région chromosomique 19q13.4 (Martin 2002) appelée « complexe des récepteurs leucocytaires » (LRC). Chez l'homme, la diversité du répertoire KIR d'un individu est le résultat de la combinaison d'un nombre variable de gènes et du polymorphisme de ces gènes (Uhrberg et al., 1997, Wilson et al., 2000, Shilling et al., 2002). En conséquence, des individus non-apparentés, n'ont pas le même répertoire KIR. Les gènes des KIR inhibiteurs qui reconnaissent HLA-C (KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3) sont situés dans la partie centromérique du locus, tandis que les gènes qui codent pour les récepteurs KIR3DL1 (capable de reconnaître HLA-B) et KIR3DL2 (qui reconnaît HLA-A) sont localisés dans la partie télomérique. Les haplotypes KIR se divisent en deux grand groupes selon les gènes qu'ils contiennent (**Figure 7**). Le type A comprend environ sept gènes et deux pseudogènes. Les haplotypes B comprennent un nombre variable de gènes (de un à plus de cinq) en plus des gènes qui sont présents dans l'haplotype A. Parmi les gènes caractéristiques des haplotypes B figurent KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3 et KIR2DS5. Les gènes KIR2DL2 et KIR2DL3 sont des allèles d'un même locus. C'est aussi le cas de KIR3DS1 et KIR3DL1. Ceux ci sont aussi associés aux haplotypes B. En général, les haplotypes B contiennent plus de gènes de KIRs activateurs que les haplotypes A. Toutes les populations humaines possèdent des haplotypes A et B mais au sein de chaque population, les fréquences des différents haplotypes possibles sont variables (Yawata et al., 2002) (**Figure 8**). Jusqu'à présent, plus de 100 profils de génotypes KIR ont été décrits. Les limites du locus KIR sont

représentées par KIR3DL3 et KIR2DL2. Entre ces deux gènes conservés, se situent un nombre variable de 7-12 gènes (Uhrberg et al., 2002, Hsu et al., 2002a, b, Wilson et al., 2000).

Expression de récepteurs de cellules NK par des sous populations de lymphocytes T activés/mémoires.

Expression des KIRs par les lymphocytes T

Les sous populations de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ et les cellules T $\gamma\delta$ peuvent exprimer des récepteurs de type NK, tels que les KIR. Chez les sujets normaux les cellules T CD4⁺ exprimant des KIRs sont détectables mais beaucoup plus rares. Les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺KIR⁺ sont présentes dans plusieurs tissus chez l'homme, tels que la rate, les amygdales, les ganglions lymphatiques, le sang (Mingari et al., 1997, Anfossi et al., 2001). Au niveau périphérique, ils représentent 4.5% de la population totale des lymphocytes T, est cette fréquence augmentera avec l'âge (Anfossi et al., 2001). L'acquisition de l'expression des KIRs a lieu après le réarrangements des loci du TCR (Uhrberg et al., 2001, Vely et al., 2001, Snyder et al., 2002). Les lymphocytes T CD8⁺ expriment principalement des KIRs inhibiteurs. Les cellules T CD8⁺KIR⁺ possèdent un phénotype de cellules T effecteur/mémoire caractérisé par la présence de CD45RA, CD45RO et l'absence ou la faible expression d'autres marqueurs tels que CD27, CD28 et CCR7 (Mingari et al., 1996, Speiser et al., 1999, Anfossi et al., 2001, Young et al., 2001).

Si les KIRs inhibiteurs sont engagés au même temps que le TCR, ils peuvent réguler négativement la fonction des cellules T selon des mécanismes similaires à ceux décrits pour les cellules NK (phosphorylation des résidus des tyrosines des ITIM, recrutement et activation de SHP1). Les KIRs inhibent la production de cytokines comme l'IFN- γ et le TNF- α ou la cytotoxicité (Ferrini et al., 1994, Vely et al., 2001, Mingari et al., 1996, Mingari et al., 1995, De Maria et al., 1997, D'Andrea et al., 1996, Bakker et al., 1998, Guerra et al., 2000). Les KIRs modulent aussi négativement la réorganisation du cytosquelette qui est induite par l'engagement du TCR (Guerra et al., 2002). Les KIRs inhibiteurs confèrent une résistance à la mort cellulaire, ceci a été observé pour des clones de cellules T et des cellules Jurkat transfectées (Young et al., 2001, Chwae et al., 2002), en interférant avec la voie de signalisation induite par Fas à travers l'induction de c-FLIP-L et la diminution de l'activité de la caspase 8 (Gati et al., 2003). Tandis que pour les cellules NK, les KIRs sont à l'origine du

recrutement de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui, via la kinase AKT, régule négativement le processus de mort cellulaire (Marti et al., 1998). Les KIRs ont aussi la capacité de prévenir l'activation d'isoformes de la Protein kinase C (PKC) (Chwae et al., 2002). (**Figure 9**).

Les mécanismes qui sont à l'origine de l'expression de KIRs par les cellules T ne sont pas bien connus. Les KIRs sont très probablement exprimés après stimulation antigénique. *In vitro*, l'engagement du TCR est nécessaire pour l'expression des KIR sur la surface cellulaire (Huard et al., 2000). Il a été proposé que la reconnaissance répétée de l'antigène par les cellules T qui expriment des KIRs inhibiteurs particuliers capables d'interagir avec des molécules de classe I autologues, seraient sélectionnées car les KIRs confèrent une résistance à la mort cellulaire induite par activation (AICD). L'expression de KIRs inhibiteurs sur les cellules T CD8+ serait la signature d'une stimulation antigénique chronique (Vivier 2004). Par ailleurs, des KIRs différents sont retrouvés sur des clones de cellules T qui partagent le même TCR. Il n'est pas clair si la qualité et/ou la quantité de la stimulation joue un rôle dans l'induction des KIRs. Il est possible que certaines conditions d'activation des cellules T puissent induire l'expression de KIRs par déméthylation de l'ADN et production de certains facteurs de transcription. L'expression des KIRs ne semble pas être inductible *in vitro* par stimulation en présence des différentes combinaisons de cytokines apparaît stable dans diverses conditions de culture (Vely et al., 2001, Gumperz et al., 1996).

Expression de NKG2A/CD94 par les lymphocytes T

Les cellules T peuvent aussi exprimer l'hétérodimère NKG2A/CD94. Au contraire des KIRs, NKG2A/CD94 est facilement induit sur les cellules T après activation par leur TCR et par stimulation avec certaines cytokines (Mingari et al., 1998, Bertone et al., 1999, Derre et al., 2002). Chez la souris, NKG2A/CD94 est induit sur les cellules T CD8+ après stimulation antigénique *in vitro* ou bien après infection avec le « lymphocytic choriomeningitis virus » (LCMV) ou *Listeria monocytogenes* ou prolifération homéostatique *in vivo* (McMahon et al., 2002). De manière similaire, pendant l'infection par le VIH chez l'homme, il y a une augmentation de la fréquence de cellules T qui sont positives pour NKG2A/CD94 (Andre et al., 1999). Il s'avère que NKG2A est détectable dans le cytoplasme des cellules et que l'activation conduit à son expression en surface. L'hétérodimère NKG2A/CD94 peut inhiber la fonction cytotoxique et la production de cytokines des cellules T (Speiser et al., 1999, Le Drian et al., 1998, Mingari et al., 1998, Dulphy et al., 2002, Perrin et al., 2002). NKG2A

apparaît sensible à la nature du peptide associé à HLA-E. Ainsi certains peptides de forte affinité pour HLA-E peuvent protéger des lignées tumorales de la lyse par des cellules T CD8+NKG2A+ (Malmberg et al., 2002). Chez la souris, NKG2A/CD94 inhibe aussi la fonction des cellules T, dans des systèmes *in vitro* ou même *in vivo* pendant l'infection par le virus du polyome (Lohwasser et al., 2001, Van Beneden et al., 2002, Moser et al., 2002). Par contre, dans quelques modèles murins, l'engagement de NKG2A/CD94 par son ligand, Qa-1 n'inhibe que marginalement l'activité des cellules T CD8+ (McMahon et al., 2002, Miller et al., 2002). Ceci pourrait être dû à la nature des peptides qui sont présentés par par Qa-1 (Vales-Gomez et al., 1999, Kraft et al., 2000). Il semble que dans des conditions particulières telle qu'une infection virale, des peptides qui ne sont pas issus de la séquence leader des molécules MHC classe I (qui se lient normalement à HLA-E et Qa-1), puissent aussi être associés à ces molécules. Ainsi, des peptides dérivés de protéines de stress (Hsp 60), de pathogènes (CMV, *Mycobacterium tuberculosis*, VHC) sont capables de se lier à HLA-E (Michaelsson et al., 2002, Heinzl et al., 2002, Tomasec et al., 2000, Ulbrecht et al., 2000, Pietra et al., 2003, Nattermann et al., 2005).

Expression d'autres récepteurs NK par les lymphocytes T

Les cellules T peuvent aussi exprimer LIR-1 (CD85j). Même si la plupart des cellules T $\alpha\beta$ qui expriment LIR-1 sont KIR négatives, une minorité peut coexprimer des KIR. LIR-1 est exprimé par davantage de cellules T CD4+ et T CD8+ que les KIRs (Young et al., 2001). Les cellules LIR-1+ sont CCR7 négatives. L'engagement de LIR1 n'a pas d'effet sur la résistance de cellules T CD8+ à l'AICD et l'inhibition de la fonction cellulaire semble bien moins robuste que celle induite par les KIR (Vivier 2004, Mingari et al., 2005).

KLRG1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily G1), un récepteur NK de type lectine dont le(s) ligand(s) est inconnu, peut aussi être exprimé par des lymphocytes T CD4+ et T CD8+. L'expression de KLRG1 peut être induite après infection par LCMV, *Toxoplasma gondii* et *L. monocytogenes* ou pendant la prolifération homéostatique (McMahon et al., 2002, Voehringer et al., 2001, Robbins et al., 2003). Les facteurs qui conduisent à l'expression de KLRG1 restent mal connus. Par exemple l'engagement du TCR ou la stimulation avec des cytokines ne suffisent pas à induire son expression (Robbins et al., 2003). Chez l'homme, les lymphocytes T CD8+ qui expriment KLRG1 se caractérisent par un phénotype de type effecteur/mémoire. Ces lymphocytes sont CCR7-CD28-CD45RA-CD45RO+ ou CCR7-

CD28-CD45RA+CD45RO- (Corral et al., 2000, Voehringer et al., 2002). KLRG1 pourrait représenter un marqueur de sénescence des cellules T CD8+ différenciées.

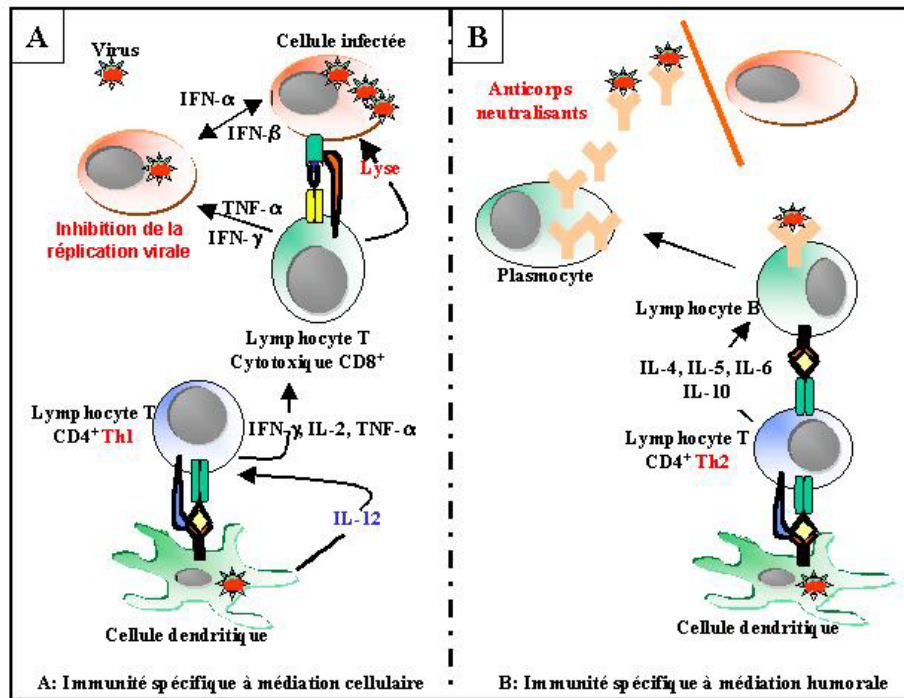


Figure 1 : Schéma de synthèse de l'influence des lymphocytes T helper dans la réponse spécifique anti-virale cellulaire (A) et humorale (B).

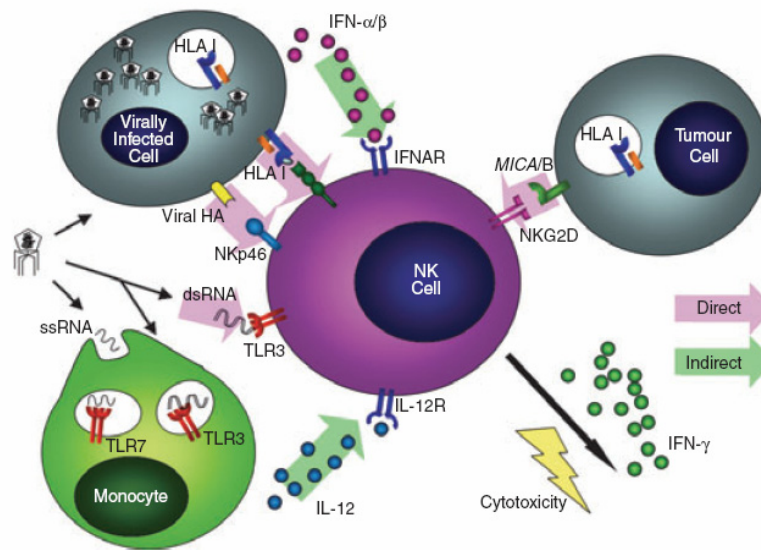


Figure 2 : Schéma de synthèse des mécanismes d'activation des cellules NK humaines par les infections virales et les cellules tumorales.

Les cellules NK reçoivent des signaux d'activation de différents types. Les récepteurs KIR des NK sont sensibles à la variation de densité des molécules HLA I en surface des cellules infectées. De même, la nature des peptides associés aux HLA I peut influencer l'interaction KIR-HLA I et donc l'information reçue par la cellule NK. Les IFN de type I produits par les cellules infectées peuvent aussi activer les fonctions effectrices des cellules NK. Des antigènes viraux tels que l'hémagglutinine (HA) peuvent être reconnus directement par des récepteurs activateurs tels que NKp46. Les ARN double brin et simple brin des virus peuvent aussi activer les NK directement par engagement de TLRs ou indirectement via la production de cytokines activatrices (IL-12) par d'autres types cellulaires réagissant à ces ARN viraux. Les NK peuvent aussi réagir à des antigènes de stress (comme MICA/B) via NKG2D. (D'après O'Connor et al., 2005 Immunology).

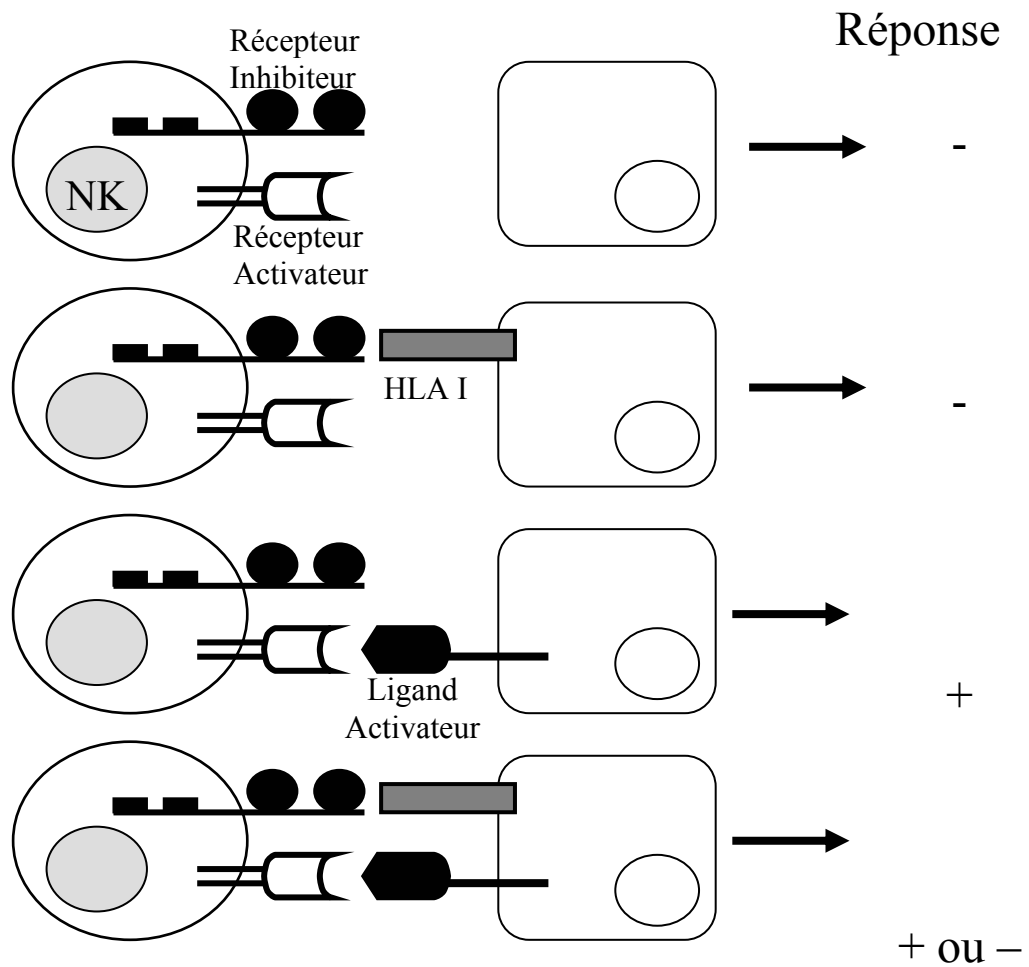


Figure 3 : Représentation schématique du modèle décrivant la régulation de la réactivité des cellules NK par les récepteurs activateurs et inhibiteurs.

Ce modèle est basé sur l'hypothèse du « soi manquant » de Karre mais il intègre un rôle important pour les récepteurs activateurs des cellules NK. Ainsi, la capacité d'une cellule NK à lyser une cible va dépendre de l'intégration de l'ensemble des signaux activateurs et inhibiteurs reçus par la cellule en fonction des récepteurs activateurs (par exemple les NCRs) et inhibiteurs (par exemple les KIRs) qui ont été engagés lors de l'interaction cellulaire.

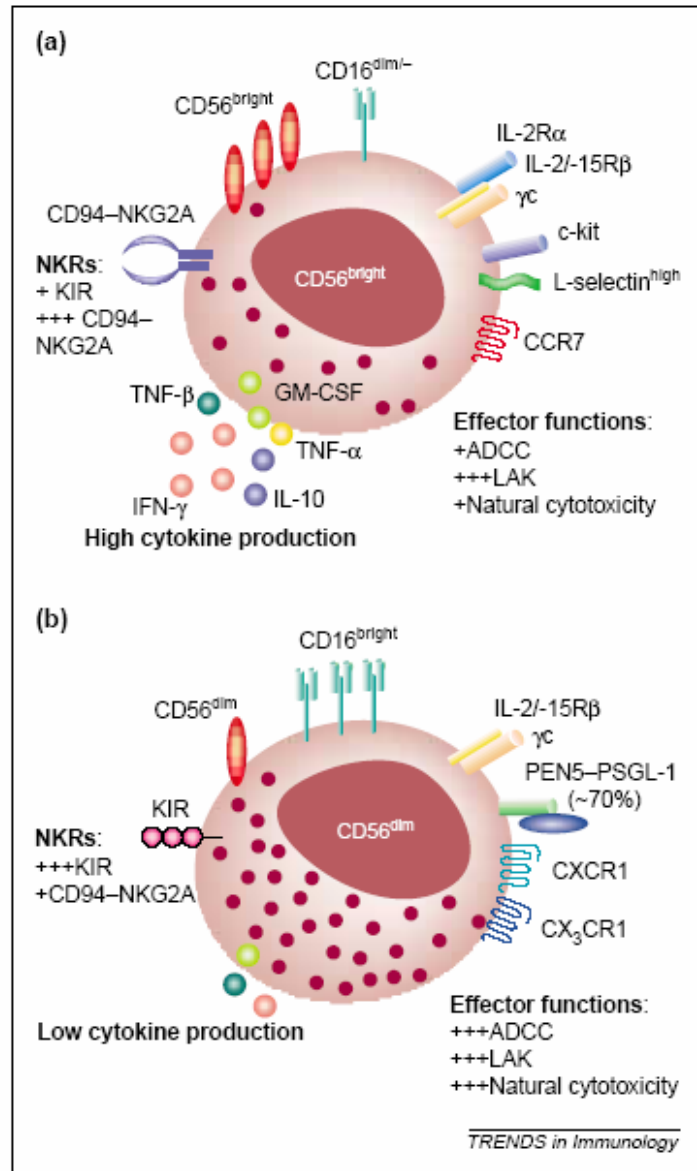


Figure 4 : Représentation schématique des caractéristiques majeures distinguant les sous populations NK CD56^{dim} et CD56^{bright} humaines.
(source : Cooper et al., 2001 Trends in Immunology.)

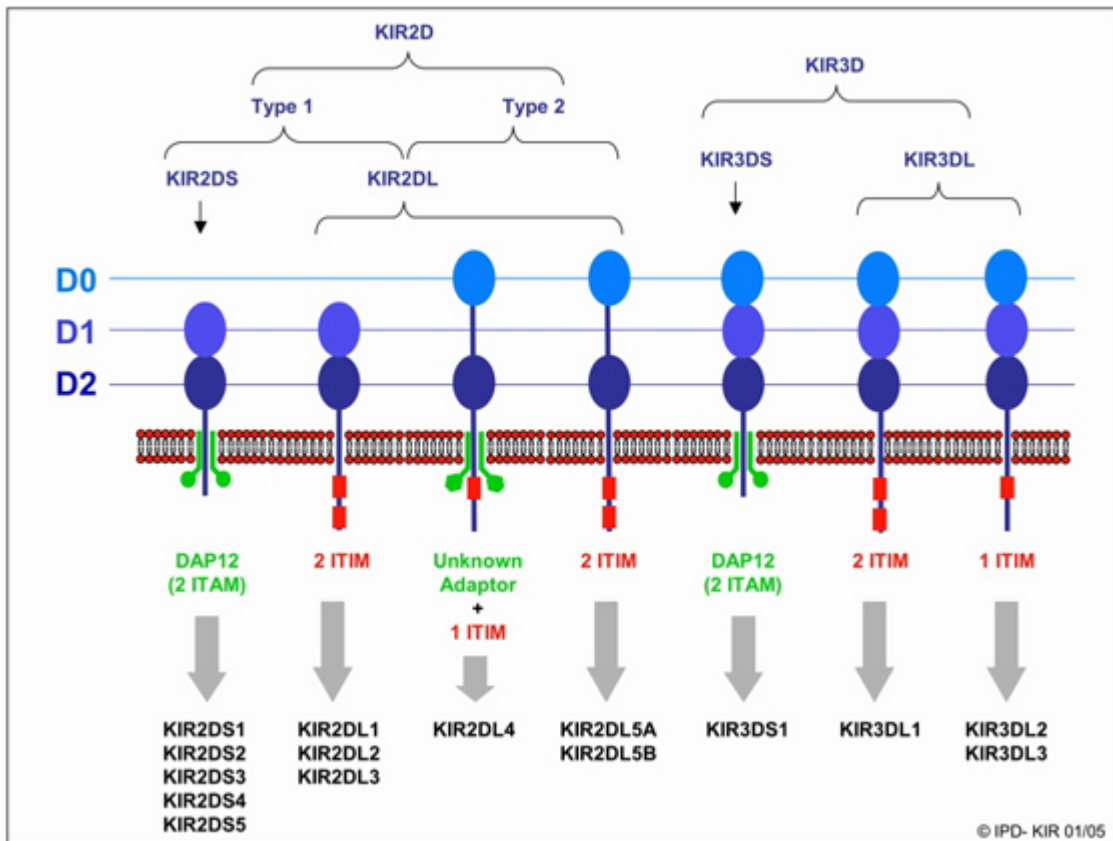


Figure 5 : Nomenclature et représentation schématique de la structure des KIR.

La nomenclature des KIRs donne une information sur le nombre de domaines de type Ig extracellulaire (**2D** ou **3D**) et la longueur de la portion intracellulaire (**L** pour « long » et **S** pour « short »), suivi d'un numéro pour distinguer les KIR avec des structures similaires (mais des séquences différentes). Par exemple, KIR2DL1 possède deux domaines de type Ig et une portion intracytoplasmique longue.

(D'après IPD-KIR database, EMBL European Bioinformatic Institute).

Inhibition Croissante

<----->

2DL1/C2	2DL1/C2	2DL1/C2	2DL2/C1	2DL2/C1	2DL3/C1
homozygote	2DL2/C1	2DL3/C1	homozygote	2DL3/C1	homozygote

----->

Activation Croissante

Figure 6 : Modèle hiérarchique du potentiel inhibiteur des interactions moléculaires KIR2DL/HLA-C. (Modifié d'après Parham, Nat. Rev. Immunol. 2005).

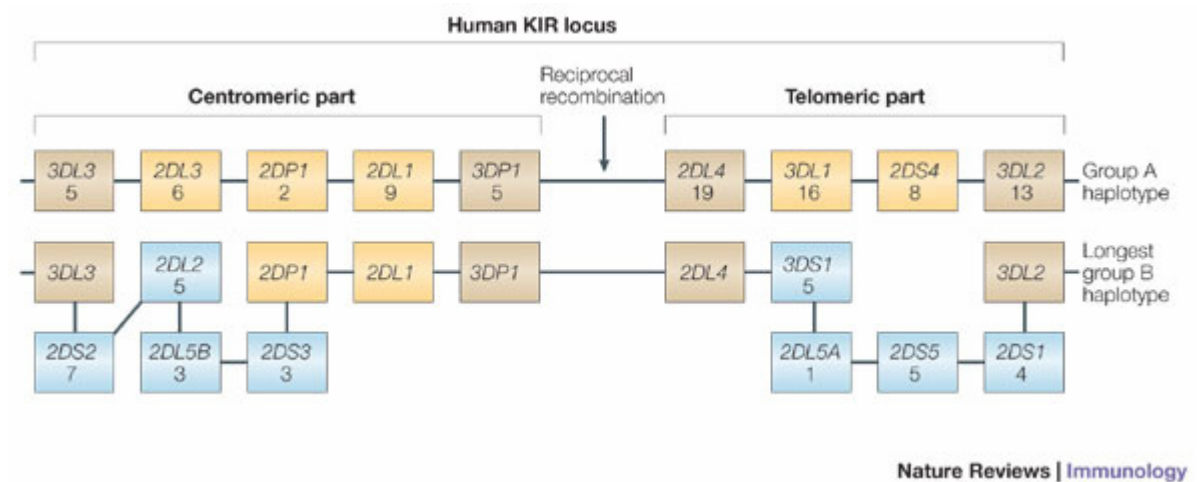


Figure 7 : Organisation du locus KIR chez l'homme.

Alignement des haplotype A le plus court et B le plus long. Le nombre des allèles connus est indiqués en dessous du nom du KIR. Les gènes présents dans les haplotypes A et B sont en orange. Les gènes conservés (framework) sont en marron. Les gènes/allèles qui sont caractéristiques des haplotypes B sont en bleu. (D'après Parham, Nat. Rev. Immunol. 2005).

KIR gene	KIR haplotype										Gene frequency (%)		
	A	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	A + B haplo- types	A haplo- types	B haplo- types
	2DL4											100	100
2DL5											27.4	0	69.1
3DL1 3DS1	L	L	L	S	S	S	S	L	L	L	88.8 11.2	100 0	71.7 28.3
3DL2											100	100	100
2DL1											96.9	100	92.1
2DL2 2DL3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	36.6 63.4	0 100	92.1 7.9
2DS1											19.0	0	47.9
2DS2											36.6	0	92.1
2DS3											15.5	0	39.0
2DS4							?				88.8	100	71.7
2DS5											8.7	0	21.9
3DL3											100	100	100
Haplotype frequency (%)	58.1	11.8	8.1	3.4	2.4	2.0	3.0	4.1	2.4	1.0			

Nature Reviews | Immunology

Figure 8 : Haplotypes KIR fréquents dans la population caucasienne.

Les dix haplotypes les plus fréquents chez la population caucasienne sont montrés. Les gènes qui sont présents dans les haplotypes A et B sont montrés en orange. Les gènes conservés sont montrés en marron. Les gènes/allèles qui sont caractéristiques des haplotypes B sont en bleu. Pour la ligne KIR3DL1 et KIR3DS1, L fait référence à la présence de KIR3DL1 et S à la présence de KIR3DS1. Pour la ligne de KIR2DL2 et KIR2DL3, 2 est utilisé pour indiquer la présence de KIR2DL2 et 3 de KIR2DL3. (D'après Parham, Nat. Rev. Immunol. 2005).

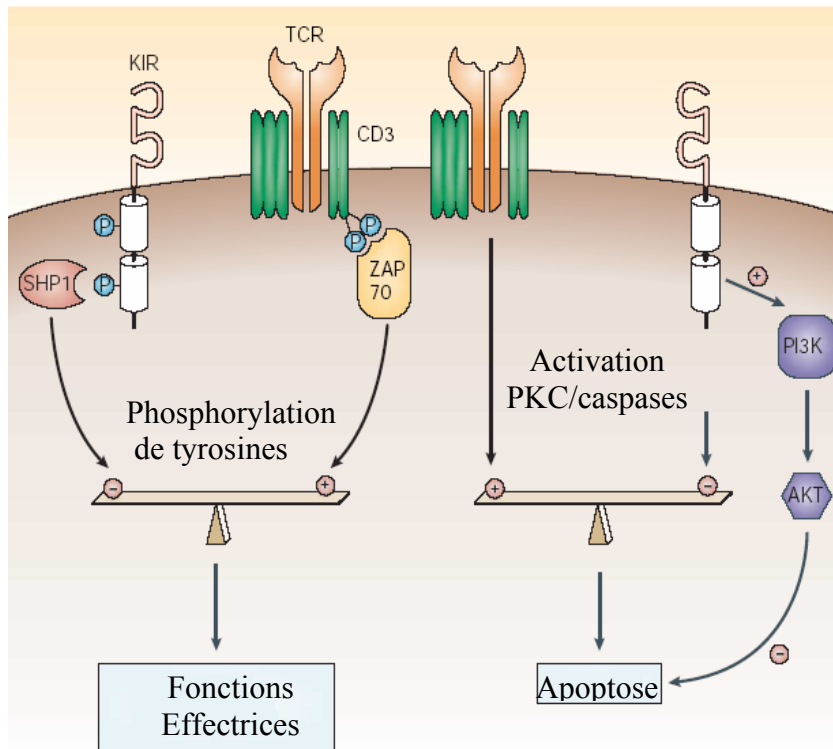


Figure 9 : Voies de signalisation intracellulaires initiées par les KIR et régulant les fonctions des cellules T. Les KIRs sont capables de moduler négativement des fonctions cellulaires telles que la production de cytokines, la cytotoxicité et la Mort cellulaire. Les ITIM des KIR inhibiteurs peuvent recruter et activer la phosphatase SHP1 qui interfère avec les événements de phosphorylation impliqués dans les voie d'activation dépendantes du TCR. Les KIR peuvent aussi réguler la mort cellulaire associée à l'activation par le recrutement de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), par la capture d'isoformes de la protein kinase C (PKC) ou par l'induction de certaines formes de molécules FLICE (cFLIP-L) et la réduction de l'activité de la caspase 8. (D'après Vivier, 2004 Nat. Rev. Immunol.).

Tableau I : Récepteurs activateurs et corécepteurs exprimés par les cellules NK humaines

Récepteur activateur	Ligand et Fonction
LFA-1 α (CD11a)	ICAM-1 (CD54) Cytotoxicité
IFN- γ R α (CD119)	IFN- γ Prolifération/Cytotoxicité
IL-2/IL-15R β (CD122)	IL-2/IL-15 Prolifération/Cytotoxicité
γ c (CD132)	IL-2/IL-15/IL-21 Prolifération/Cytotoxicité
KIR2DS1 (CD158h)	HLA C groupe 2 (Cw2/4/5/6) Prolifération/Cytotoxicité
KIR2DS2 (CD158j)	HLA C groupe 1 (Cw1/3/7/8) Prolifération/Cytotoxicité
KIR3DS1 (CD158c2)	HLA Bw4 ? Cytotoxicité
KIR2DL4 (CD158d)	HLA G ? Production Cytokines
KIR2DS4	HLA-Cw4
Fc γ RIII (CD16)	IgG Fc ADCC
NKR-P1A (CD161)	? Cytotoxicité
CD2	CD58 Cytotoxicité
IL-12R β (CD212)	IL-12 Production Cytokines
DNAM-1 (CD226)	Nectin-2/PVR Cytotoxicité
2B4 (CD244)	CD48 Cytotoxicité/Production Cytokines
IL-2R α (CD25)	IL-2 Prolifération
NKG2D (CD314)	MICA/B, ULBP Cytotoxicité
NKG2C/CD94 (CD159c)	HLA E Cytotoxicité
NKp46 (CD335)	Hemmag. Influenza Cytotoxicité/Production Cytokines
NKp44 (CD336)	? Cytotoxicité
NKp30 (CD337)	? Cytotoxicité/Production Cytokines
NKp80	? Cytotoxicité
ILT-1/7/8 (CD85b/f/g)	? Cytotoxicité
Tactile (CD96)	CD155 Cytotoxicité
IFN-IR	IFN-I Cytotoxicité

Tableau II : Récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules NK humaines

Récepteur inhibiteur	Ligand
LILRB1 (ILT2/LIR1 CD85j)	HLA-A,B,C,E,F,G
KIR3DL3 (CD158z)	?
KIR2DL3 (CD158b2)	HLA-C groupe 1
KIR2DL2 (CD158b1)	HLA-C groupe 1
KIR2DL1 (CD158a)	HLA-C groupe 2
KIR2DL4 (CD158d)	HLA-G ?
KIR3DL1 (CD158e1)	HLA-B Bw4
KIR2DL5A (CD158f)	?
KIR2DL5B	?
KIR3DL2 (CD158k)	HLA-A3, A11 ?
KLRD1/KLRC1 (CD94/NKG2A)	HLA-E

D'après Lanier L. Annu. Rev. Immunol., 2005.

II – Fonctions et organisation du foie

Généralités

Chez l'homme adulte, le foie est un organe volumineux qui pèse 2 kilogrammes en moyenne. Le foie est à l'interface du tractus gastro-intestinal et de la circulation systémique. Les principales fonctions du foie incluent la nutrition (métabolisme, dégradation, stockage des molécules absorbées par l'organisme, production de sels biliaires), un rôle dans la réponse aux infections (élimination de pathogènes, synthèse de molécules impliquées dans la défense telles que les protéines de phase aiguë, la protéine C-réactive ou les composants du complément), et un rôle de détoxification (**Figure 10**).

La circulation sanguine arrive dans le foie à travers la veine porte hépatique et l'artère hépatique et repart à travers la veine cave par intermédiaire de la veine hépatique. L'arrivée de sang oxygéné dans le foie est assurée par l'artère hépatique. La veine porte permet l'accès au foie de molécules absorbées dans l'intestin, telles que les sucres, les peptides et les acides gras, de cellules circulantes du système immunitaire, comme les lymphocytes et les précurseurs de cellules dendritiques, mais aussi d'agents pathogènes et de toxines.

Parmi les propriétés distinctives du foie il faut citer sa capacité toléro-gène ainsi que sa haute capacité d'auto-régénération. Etant donné que le foie reçoit l'afflux constant de nutriments, des mécanismes existent pour assurer une tolérance vis à vis des molécules étrangères provenant du tractus digestif et arrivant par la veine porte (Cantor et al., 1967, Crispe et al., 2000, Crispe 2003). Par ailleurs, le foie est un des organes les mieux acceptés pendant les transplantations, dû à ses propriétés toléro-gènes (Starzl et al., 1996, Poynard et al., 1999).

Quant au processus de régénération du foie, celui-ci est normalement déclenché suite à la destruction partielle ou totale du tissu hépatique provoquée par une infection virale, par la présence de substances toxiques ou bien par une résection hépatique. La régénération du tissu hépatique incluse la réorganisation de l'architecture du foie, la prolifération synchronisée des cellules hépatiques et le remodelage de la matrice extracellulaire (Taub et al., 2004, Markiewski et al., 2006).

Le foie est composé de deux lobes dont le parenchyme est constitué par les unités fonctionnelles du foie : les lobules de forme hexagonale. Ces lobules côtoient des structures conjonctives dénommées « espaces portes » qui sont formées par des vaisseaux lymphatiques, par un ou plusieurs canaux biliaires et par les ramifications de la veine porte (veinules) et de l'artère hépatique (artérioles) qui les irriguent. Le sang qui repart des lobules le fait à travers

la veine hépatique. Les lobules du foie sont constitués par des travées d'hépatocytes (ou travées de Remak) rayonnant à partir du centre du lobule, des capillaires sinusoides et de populations cellulaires et lymphocytaires particulières (**Figure 11**). Les hépatocytes représentent la population cellulaire majoritaire du foie (~80%). Parmi les fonctions remplies par ces cellules, il faut mentionner la production de bile qui se déverse dans les canaux biliaires. Par ailleurs, les hépatocytes peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T car ils expriment constitutivement des molécules CMH classe I et CD1 (Bumgardner et al., 1990, Bertolino et al., 2002) et pendant un processus inflammatoire, des molécules MHC II ou de costimulation, induites. Cependant, la présentation antigénique par les hépatocytes a tendance à induire la mort cellulaire des lymphocytes T (Bertolino et al., 1998).

Les capillaires sinusoides des lobules sont des capillaires formés de cellules endothéliales dénommées « liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) qui constituent un endothélium « fenêtré » (**Figure 12**) et dépourvu de membrane basale. Les LSECs sont capables de reconnaître des structures microbiennes conservées particulières (PAMPS) car ils possèdent des PRRs tels que les récepteurs de type « scavenger » ou les récepteurs au mannose. Les LSECs expriment des molécules de costimulation ainsi que des molécules du CMH classe I et classe II, ce qui leur permet de présenter des antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ (Scoazec et al., 1990, Knolle et al., 1998, Knolle et al., 2001).

Sur l'endothélium des capillaires sinusoides se situent les macrophages qui résident dans le foie (cellules de Kupffer), ceux ci peuvent éventuellement migrer dans un espace dénommé « Espace de Dissé » qui sépare les hépatocytes de l'endothélium et, entrer en contact avec les hépatocytes. Les cellules de Kupffer constituent la plus importante population de macrophages de l'organisme humain. Elles sont essentielles pour la phagocytose de particules étrangères et de microorganismes, pour la présentation antigénique, ainsi que pour la production de cytokines dont les IFN- γ et - α , l'IL-10, l'IL-12, l'IL-1, IL-6 et le TNF- α (Kirn et al., 1980, Kutteh et al., 1991, Knolle et al., 1998)

Au niveau de l'espace de Dissé se trouvent des cellules avec une morphologie en étoile (Stellate cells) qui assurent le stockage de vitamine A et la synthèse de matrice extracellulaire, dont elles sont les principales cellules productrices. Elles jouent un rôle majeur dans la progression de la fibrose et dans les pathologies du foie (Bataller et al., 2005, Ramadori et al., 2004, Marra et al., 1999). Les lymphocytes qui circulent à travers les capillaires, peuvent interagir avec les LSECs, les cellules de Kupffer ou bien les hépatocytes, à travers l'endothélium des capillaires sinusoides. Les lobules hépatiques se caractérisent aussi par la présence de différentes populations de lymphocytes.

Populations lymphocytaires intrahépatiques

Un grand nombre de cellules mononuclées infiltrent le foie adulte normal (Doherty et al., 1999; Norris et al., 1998; Norris et al., 1999) (**Tableau III**) notamment dans la région portale et au niveau des sinusoides. Il a été proposé que le foie adulte pourrait être un site de développement extra-thymique des lymphocytes T mais cette notion reste très controversée.

Dans le foie, la majorité des cellules T (CD3+) expriment la molécule CD8 tandis qu'une minorité expriment CD4. De ce fait, le ratio intrahépatique CD4:CD8 est de 1 :3.5 tandis que dans les PBL il est de 2 :1. La plupart de cellules T intrahépatiques, soit CD4+ ou bien CD8+ possèdent un phénotype apparenté à celui de cellules activées (Pruvot et al., 1995). Des études faites sur des modèles animaux ont montré que le foie est capable de capturer et de retenir de cellules T CD8+ activées (Mehal et al., 1999, John et al., 2004). Par ailleurs, par comparaison avec les PBL, la fréquence de lymphocytes CD3+TCR $\gamma\delta$ + ainsi que les CD4CD8 double positives ou CD4CD8 double négatives est plus importante dans le foie. Les lymphocytes T conventionnels du foie produisent des cytokines de type Th1 (IFN- γ , TNF- α , et IL-2) après activation (Doherty et al., 1999; Rowell et al., 1997).

Les cellules T $\gamma\delta$ représentent 10 à 30 % des cellules T du foie humain sain (Norris et al., 1998; Norris et al., 1999). Ils sont capables de produire des cytokines dont l'IFN- γ , l'IL-2 et le TNF- α (Kenna et al., 2004) et pourraient participer aux réponses anti-virale locales (Sciammas et al., 1994). Chez l'homme, les lymphocytes non classiques NK-T du foie sont soit $\alpha\beta^+$ (80%) ou $\gamma\delta^+$. Ces cellules sont en majorité positives pour CD8 $\alpha\alpha$. 1 à 4% des NK-T d'un foie normal sont V α 24+ (Norris et al., 1999) et peuvent produire de l'IFN- γ et du TNF- α (Kenna et al., 2003).

Les premières descriptions de cellules NK intrahépatiques ont été faites chez le rat. Ces cellules ont été dénommées « Pit cells » (**Figure 13**). Les cellules NK intrahépatiques sont essentiellement CD16 $^-$ à la différence des cellules circulantes. Ces cellules se situent au niveau des sinusoides et présentent un aspect granulaire ainsi qu'une taille importante. Elles participent activement à la réponse immunitaire antivirale et antibactérienne (Biron, et al., 1997; Corado et al., 1997; Trinchieri, 1989). La population de cellules NK semble être enrichie au niveau du foie sain avec une fréquence d'environ 30 % versus 12-13 % au niveau périphérique (Norris et al., 1998, Norris et al., 1999).

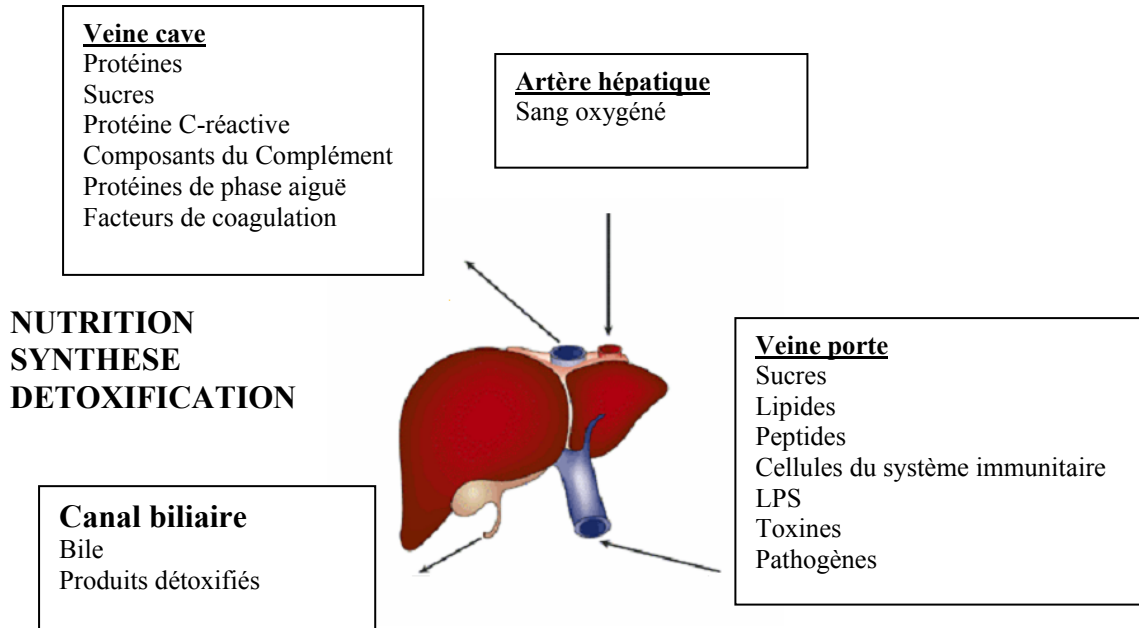


Figure 10. Représentation schématique du foie.
(Modifié d'après Crispe N., 2003, Nat. Rev. Immunol.).

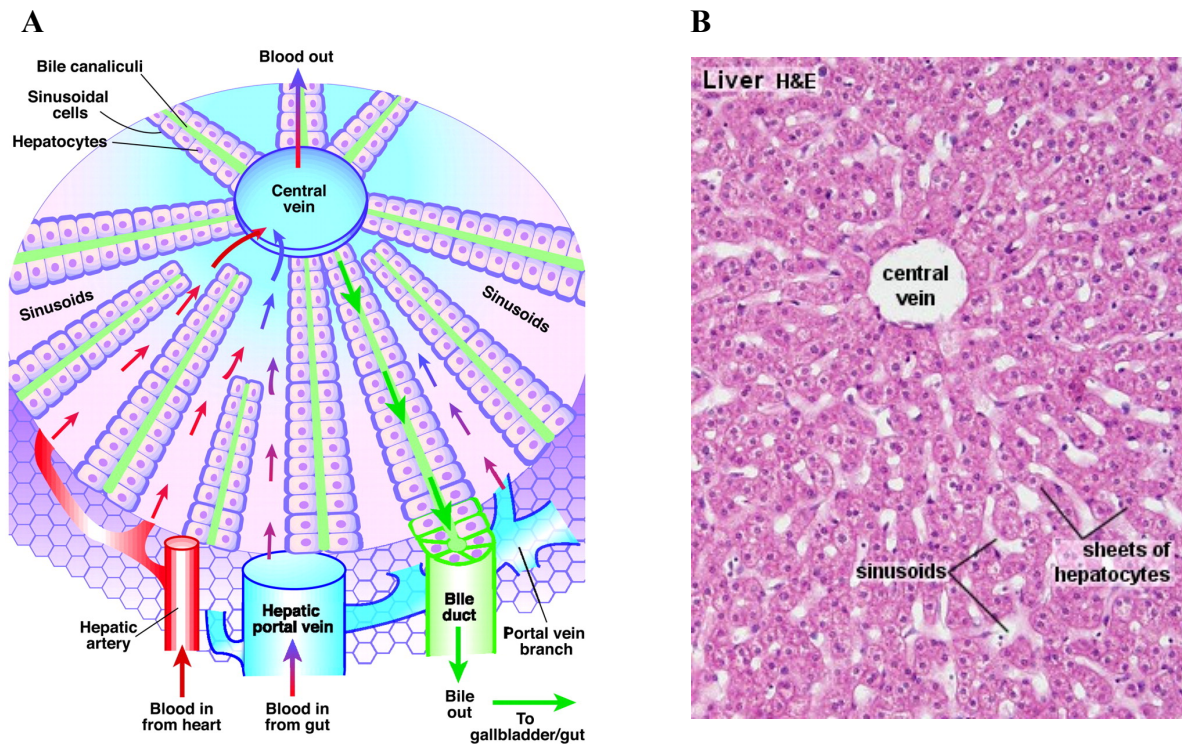


Figure 11. Architecture du tissu hépatique.

(A) Représentation schématique. Les hépatocytes sont organisés en rangées bordées par les sinusoides (en rose). Le sang arrive par l'artère hépatique en provenance du cœur et par la veine porte hépatique en provenance de l'intestin, draine le tissu et repart au cœur par les veines centrales qui rejoignent la veine cave inférieure. Les hépatocytes sont en contact avec le plasma, ce qui permet l'échange de nutriments et de métabolites (D'après Strain, Science, 2002). (B) Microscopie optique après coloration E/H. (D'après www.anatomy.dal.ca).

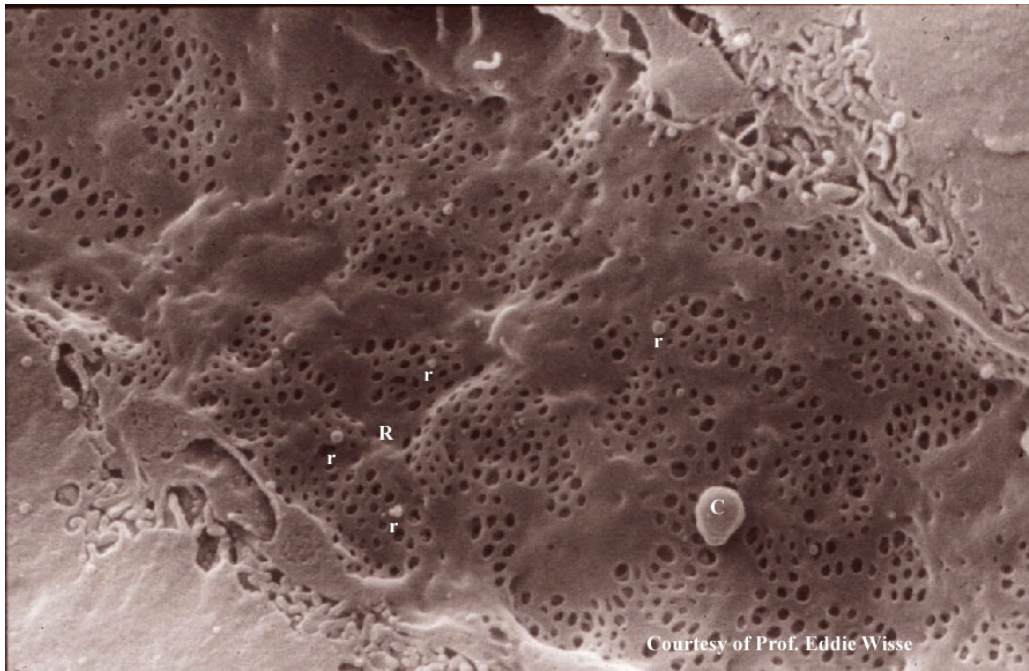


Figure 12 : Observation par microscopie électronique à balayage de la paroi interne d'un capillaire sinusoïde du foie.

Les pores de l'endothélium dit fenêtré sont d'environ 100 nm et peuvent s'opposer au passage de chylomytron (C) vers l'espace de Dissé mais permettent le passage de particules plus petites (r).
Grossissement : 30000. (Site internet de l'Université d'Otago, Nouvelle Zélande).

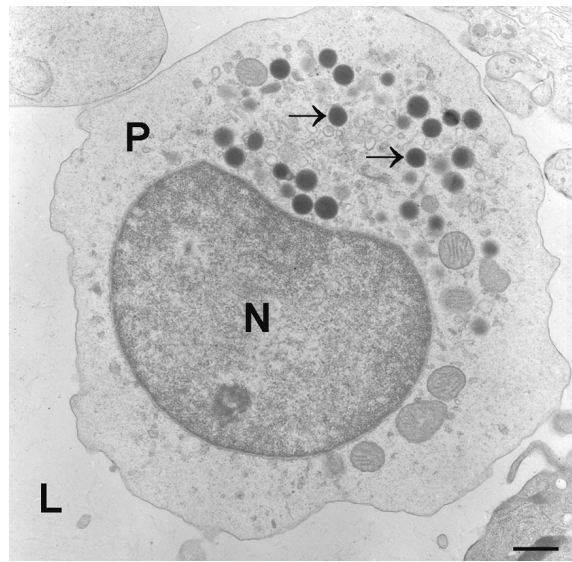


Figure 13 : Cellule NK hépatique ou cellule « Pit » (P).

Observation par microscopie électronique à transmission dans la lumière (L) d'un sinusoire chez le rat. Les zones de forte densité (flèches) correspondent à des granules (barre = 500 nM). (D'après Braet, Fraser, et Mccuskey; Hepatology, 2003).

Tableau III : Populations de lymphocytes infiltrant le foie sain.

Population	Foie	PBL	p
*CD8+	71.8 % (57-89)	38.4 % (23-45.5)	0.0001
*CD4+	22.1% (7-31)	59.6 (49-75.5)	0.0001
*CD4+CD8+	5.5% (3-11.6)	1.3% (0.7-3.6)	0.007
*CD4-CD8-	14.5% (2.7-29)	5% (2.1-10.8)	0.02
*TCR $\alpha\beta$	84.9% (66-93.7)	95.9% (94-98.5)	0.005
*TCR $\gamma\delta$	15.4% (6.8-34)	3.5% (0.9-4.7)	0.004
*NK : CD3-CD56+	30.6% (11.6-51.3)	12.8% (1-22)	0.004
*LB: CD19+	6.1% (1-8.6)	-	-
**NKT : V α 4+	0.75%	0.61%	NS
**NKT : V α 24+V β 11+	0.48%	0.018%	0.002

Les valeurs signalées par * sont reprises de Norris *et al.*, 1998. Les fréquences moyennes et (valeurs extrêmes) de chaque population sont indiquées. La proportion de chaque population correspond à leur fréquence parmi les cellules CD3+ à l'exception des cellules NK (CD3-CD56+) et des lymphocytes B (CD19+) dont la fréquence est indiquée par rapport à la population totale de lymphocytes intrahépatiques. Foie n = 15, PBL n = 10 (différents individus pour foie et PBL).

Les valeurs signalées par ** sont reprises de Kenna *et al.*, 2003 et correspondent à la médiane de la fréquence. Foie n = 7, PBL n = 7 (mêmes individus pour foie et PBL). NS : non significatif

III - L'Hépatite virale C

Histoire naturelle de l'Hépatite C

Le virus de l'Hépatite C (VHC) infecte 3% de la population mondiale (170 millions de personnes). Parmi les individus infectés, 80% développent une Hépatite C chronique (cHC), dont 10 à 20 % développent une cirrhose, et 1 à 5% un carcinome hépatocellulaire. La principale voie de contamination par le VHC est la voie sanguine. L'apparition de l'ARN viral est un des premiers signes d'infection par le VHC, il est détectable dans le sérum 1-3 semaines après la contamination. Les anticorps produits par l'organisme et capables de reconnaître le virus, sont détectables pendant la phase aiguë de la maladie dans 50 % à 70 % des cas, dans les autres cas, ils peuvent apparaître plus tardivement. L'hépatite C aiguë non résolue devient chronique. Cette chronicité est caractérisée par la persistance de l'ARN du VHC dans le sérum pendant plus de six mois après la phase aiguë. Plusieurs facteurs influencent l'évolution de l'Hépatite C chronique parmi lesquels l'âge, le sexe, la consommation d'alcool et d'autres moins bien caractérisés telles des facteurs métaboliques, génétiques ou immunitaires.

L'hépatite se caractérise par la destruction des hépatocytes et de l'inflammation (activité nécrotico-inflammatoire) auxquelles sont associées des phénomènes de fibrose. La nécrose hépatocytaire dite périportale correspond à la destruction des hépatocytes qui bordent les espaces portes. L'inflammation portale est caractérisée par la présence de lymphocytes dans les espaces portes. Ils constituent des agrégats nodulaires qui possèdent la structure de follicules lymphoïdes. Ces nodules comprennent des cellules dendritiques, des lymphocytes B (dans le centre germinatif et la région du manteau) et des lymphocytes T qui expriment les molécules CD4 et CD8 et qui forment une couronne périfolliculaire (Mosnier et al., 1993). Il est considéré que la fibrose est la conséquence de l'évolution de l'activité nécrotico-inflammatoire. Lors de l'analyse histologique du tissu hépatique malade, il est aussi possible de détecter une accumulation de lipides dans les hépatocytes (stéatose). Ce phénomène est plus couramment présent chez les individus infectés par le VHC de génotype 3a et pourrait être dû à un effet cytopathogène provoqué par le virus lui-même. Chez quelques patients, une cholangite, qui correspond à des lésions inflammatoires des canaux biliaires, est observable.

Recrutement de cellules T non-spécifiques pendant cHC

Durant la phase chronique, le recrutement intrahépatique de cellules T non spécifiques du VHC pourrait être un facteur qui contribuerait à la progression des lésions et à la non-résolution de l'infection. En situation de résolution, le recrutement de cellules T CD8+ spécifiques du VHC en conjonction avec la présence de cellules T CD4+ fonctionnelles pourrait aboutir dans l'éradication du virus en absence de lésions tissulaires incontrôlées. A l'opposé, l'absence ou la présence de cellules T CD8+ qui ciblent seulement quelques épitopes du VHC, accompagné d'un recrutement de cellules non-spécifiques, conduirait au développement des lésions et à l'échec du contrôle de la réplication virale (Bertoletti et al., 2000). (**Figure 14**).

Fibrose

Le développement et la progression de la fibrose pendant l'hépatite C chronique sont associés à plusieurs facteurs. Les cellules étoilées présentes dans le tissu hépatique, jouent un rôle prépondérant dans la synthèse des composants de la matrice extracellulaire. En phase chronique, l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire (MEC) est altéré ; notamment sous l'effet de cytokines produites par différents types cellulaires. (**Figure 15**). Les facteurs produits par les hépatocytes ou les cellules de Kupffer en réponse à diverses agressions et infections causent l'activation des cellules étoilées qui sont à l'origine de la fibrogénèse (**Figure 16**). Par exemple, l'infection des hépatocytes par le VHC induit la production d'espèces réactives de l'oxygène et le recrutement de lymphocytes qui conduisent à l'activation des cellules étoilées et à la production de collagène. Par ailleurs, plusieurs protéines du VHC peuvent promouvoir directement l'activation de ces cellules (Bataller et Brenner, 2005, Friedman et al., 2003). Les cellules étoilées activées produisent aussi des cytokines qui aggravent l'inflammation, créant un cercle vicieux. La progression de la fibrose est favorisée par des molécules comme le "Monocyte chemotactic protein type 1" (MCP-1), RANTES et le TGF- β et est inhibée par l'IL-10 et l'IFN- γ . Chez l'homme, le TGF- β serait un médiateur positif de la fibrogénèse. Il favorise la transformation des cellules étoilées en cellules du type myofibroblastes, stimule la fabrication de composants de la MEC et en inhibe leur dégradation. Les mécanismes fins du développement de la fibrose pendant l'Hépatite virale C sont mal connus en raison de l'absence d'un modèle d'étude.

Caractéristiques moléculaires du VHC

Le VHC appartient à la famille de *Flaviviridae*, et au genre *hepacivirus*. Les particules du VHC comporte une enveloppe lipidique qui contient les protéines E1 et E2 qui interagissent pour former un hétérodimère non-covalent (Op De Beeck et al., 2001). A l'intérieur de la capsid se trouve le génome viral constitué d'une molécule d'ARN simple brin positif de 10000 nucléotides (**Figure 17**). Il fonctionne directement comme un ARN messenger dans le cytoplasme de la cellule infectée où la synthèse de la polyprotéine virale de 3010-3011 acides aminés a lieu. Ceci est possible grâce au site IRES situé en 5' de l'ARN virale qui permet sa reconnaissance par les ribosomes de la cellule hôte (Tsukiyama-Kohara et al., 1992).

La polyprotéine synthétisée est la cible de protéases virales et cellulaires qui libèrent les protéines structurales (protéine de la capsid C, glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2), la protéine p7, et les protéines non structurales (NS) 2, 3, 4A, 4B, 5A et 5B. Suite à un glissement du complexe ribosomal pendant le processus de traduction une protéine supplémentaire dénommée protéine F pourrait être synthétisée en faibles quantités. Même si des anticorps contre la protéine F seraient détectés dans le sérum de patients infectés par le VHC, sa fonction reste à établir (Xu et al., 2001).

Le VHC est caractérisé par une grande variabilité génétique. Cette variabilité peut être expliquée par le taux de réplication virale élevé (10^{12} virions par jour) (Neumann 1998) et le manque de fidélité de la ARN polymérase virale, qui est dépourvue d'activité 3'-5' exonucléase correctrice conduisant à un taux de mutation élevé estimé à 1 nucléotide sur 1000 par an. L'analyse phylogénique a permis de distinguer six génotypes (numérotés de 1 à 6) et 50 sous-types (identifiés avec une lettre, par exemple : 1b). Les différents génotypes possèdent une séquence de nucléotides qui diverge de 20-35% et les sous-types diffèrent de 10-25% dans leur séquence. Dans chaque patient infecté par le VHC, le virus circule sous la forme d'une population hétérogène de variants, dénommés « quasi-espèces » (Simmonds et al., 1993, Bukh et al., 1995).

Cycle cellulaire du VHC (Figure 18)

Pendant longtemps, l'étude du cycle cellulaire du VHC a été difficile dû à l'absence d'un système efficace de culture. La production de vraies particules virales infectieuses en culture est très récente (Lindenbach et al., 2005, Wakita et al., 2005). Le VHC possède un tropisme particulier pour les hépatocytes, ceci ferait de la foie le principal site de réplication virale. Cependant, étant donné que l'ARN viral (brin d'ARN positif) et son intermédiaire de

réplication (brin d'ARN négatif) sont détectés dans d'autres cellules telles que les DC et les cellules de Kupffer mais aussi les neutrophiles, les lymphocytes T et B, il a été proposé que le VHC serait capable de se répliquer ailleurs que dans les hépatocytes (Bain et al., 2001, Navas et al., 1998, Chang et al., 2000, Blight et al., 1992, Crovatto et al., 2000, Lerat et al., 1998, Muller et al., 1993)

L'identité du récepteur reconnu par le VHC et qui permet l'internalisation, n'est pas définitivement connue. Nonobstant, quelques molécules candidates ont été proposées (Cocquerel et al., 2006). Le récepteur des LDL pourrait fonctionner comme récepteur (Agnello et al., 1999, Wunschmann et al., 2000) du fait que le VHC interagit physiquement avec les particules des LDL et VLDL (Thomssen et al 1992, André et al 2002). La protéine E2 du VHC est capable de se lier *in vitro* à CD81 qui est présent sur la membrane cellulaire des hépatocytes ainsi que sur de nombreuses types cellulaires (Pileri et al., 1998, Wunschmann et al., 2000). C'est aussi à travers E2 que le VHC peut interagir avec d'autres molécules telles que le récepteur « scavenger » humain de classe B type I (SR-BI) (Scarselli et al., 2002), les molécules L-SIGN (liver and lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin) et DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin) (Lozach et al., 2003, Gardner et al., 2003, Pohlmann et al., 2003). Un travail très récent a montré que les cellules endothéliales des sinusoides du foie humain (LSECs) expriment DC-SIGN et L-SIGN qui reconnaissent E2. Même si le VHC ne peut pas se répliquer dans les LSECs, ces cellules pourraient capturer le virus sur leur surface pour ensuite le transférer aux hépatocytes qui expriment CD81 et SR-BI et qui seraient infectés par le VHC (Lai et al., 2006).

Une fois que le virus est rentré dans la cellule, le génome viral est libéré dans le cytoplasme, où la synthèse de la polyprotéine a lieu. Le clivage de la polyprotéine est effectué par une protéase cellulaire et deux protéases virales (Grakoui et al., 1993a). Une signal peptidase localisée dans le réticulum endoplasmique assure le clivages C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2. Deux protéases virales clivent les protéines non structurales. La protéase dépendante du zinc NS2/NS3 (formée par l'extrémité C-terminale de NS2 et extrémité N-terminale de NS3 découpe d'une manière autocatalytique la jonction NS2/NS3 (Grakoui et al., 1993b). NS3 associée à son cofacteur NS4A va être responsable du clivage du reste des jonctions : NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B (Grakoui McCourt, et al., 1993).

Le complexe de réplication du VHC est constitué par l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (NS5B) qui s'associe avec les autres protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A) ainsi que avec des protéines de l'hôte (Ishido et al., 1998). La réplication de

l'ARN commence avec la synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative, qui conduirait à un intermédiaire d'ARN double brin qui peut servir de matrice pour la synthèse du brin d'ARN positif qui à son tour est capable de rentrer dans un nouveau cycle de réplication ou traduction ou bien d'être empaqueté dans des particules. NS3, de part son activité hélicase permettrait d'une part, de séparer les brins positifs et négatives de l'ARN virale pendant l'étape de réplication, d'autre part, de faciliter l'accès de l'ARN polymérase NS5B aux régions non codantes, notamment l'IRES dans la partie 5' et la région 3' NTR qui possèdent des structures très repliées (Kim et al., 1997). Les mécanismes qui interviennent dans l'assemblage de la nucléocapside du VHC n'ont pas tous éclaircis. Une hypothèse est que les nucléocapsides se recouvriraient d'une enveloppe à l'intérieur du réticulum endoplasmique par bourgeonnement, et que par la suite, les particules virales seraient libérées à l'extérieur de la cellule par exocytose (**Figure 18**).

Réponse immunitaire contre le VHC :

Réponse spécifique et résolution

Les individus qui arrivent à résoudre l'infection par le VHC sont ceux chez lesquels il est possible de détecter des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques pour plusieurs épitopes du virus (réponse multispécifique) pendant une période durable (réponse soutenue) (**Figure 14**). Au contraire, les patients où l'infection persiste, présentent une réponse immunitaire qui est dirigée contre quelques épitopes viraux seulement (réponse limitée) et qui est transitoire (Rehermann et al., 2005, Shoukry et al., 2004). Même si la participation des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ dans l'élimination du VHC pendant la phase aiguë de l'infection n'est pas encore complètement comprise, des études chez le chimpanzé où les lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺ ont été éliminés, suggèrent fortement qu'ils jouent un rôle centrale dans la réponse immunitaire contre le virus (Grakoui et al., 2003, Shoukry et al., 2003). Chez les individus capables d'éradiquer le VHC, les réponses T CD4⁺ peuvent cibler jusqu'à quatorze épitopes (Day et al., 2002). Les lymphocytes T CD4⁺ ciblent principalement les épitopes présents dans les protéines non structurales du VHC, en particulier NS3-NS4 (Diepolder et al., 1997, Hoffman et al., 1995, Gerlach et al., 2005). Ces cellules produisent principalement de l'IFN- γ et de l'IL-2 (Chang et al., 2001, Gerlach et al., 1999, Cucchiari et al., 2000, Tsai et al., 1997). Une liste d'épitopes reconnus par les lymphocytes T CD4⁺ VHC spécifiques chez des patients dans la phase aiguë de l'infection est montrée dans le **Tableau IV**. L'éradication du virus pendant la phase aiguë de l'Hépatite C dépend beaucoup de la multispécificité de la réponse T CD8⁺, qui peut cibler entre huit et douze épitopes (Gruener et

al., 2000, Lechner et al., 2000, Ward et al., 2002, Koziel et al., 1995) (**Tableau V**). La proportion de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VHC est beaucoup plus importante pendant la phase aiguë que pendant la phase chronique de l'infection, avec des fréquences qui vont de 0,25 à 3,5% dans la première à moins de 0,1% dans la deuxième (Gruener et al., 2000, Lechner et al., 2000, Sobao et al., 2001). Chez les chimpanzés qui éradiquent le virus, il y a une régulation positive des gènes qui sont induits par l'IFN- γ dans le foie (Su et al., 2002) ainsi qu'une accumulation intrahépatique de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques du virus entre 8-14 semaines après l'infection (Cooper et al., 1999, Thimme et al., 2002, Neumann-Haefelin et al., 2005).

Réponse spécifique et chronicité

Les patients infectés par le VHC qui évoluent vers la chronicité ne développent pas de réponse cellulaire T CD4⁺ et T CD8⁺ VHC spécifique ou bien cette réponse cellulaire est oligo ou monospécifique pendant la phase aiguë (Diepolder et al., 1995, Gerlach et al., 1999, Gruener et al., 2000, Lechner et al., 2000, Missale et al., 1996) et pendant la phase chronique de l'infection (Battegay et al., 1995, Cerny et al., 1995, Chang et al., 2001, Ferrari et al., 1994, Koziel et al., 1993, Koziel et al., 1995, Lauer et al., 2002, Reherrmann et al., 1996, Wong et al., 2001) (**Figure 14**). Il est important de noter que les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques du VHC sont détectables au niveau intrahépatique chez des patients atteints d'Hépatite C chronique (He et al., 1999, Minutello et al., 1993, Grabowska et al., 2001, Penna et al., 2002, Wong et al., 1998, Schirren et al., 2000, Koziel et al., 1995, Koziel et al., 1992). La réponse T spécifique semblerait être enrichie au niveau du foie par rapport à la périphérie et serait à l'origine de la production de cytokines du type Th1 (Minutello et al., 1993, He et al., 1999, Penna et al., 2002, Schirren et al., 2000, Grabowska et al., 2001, Koziel et al., 1995, Bertoletti et al., 1997). Quelques études montrent qu'il aurait une corrélation négative entre la magnitude de la réponse T anti-VHC et la virémie, et suggèrent que la réponse T VHC spécifique intrahépatique pourrait contrôler partiellement la charge virale (Freeman et al., 2003, Nelson 1997). Cet observation n'a pas pu être confirmé par d'autres travaux (Wong et al., 1998). Par ailleurs, la population de cellules VHC spécifiques T CD4⁺ semblerait être plus difficile à détecter que celle de lymphocytes T CD8⁺ pendant la phase chronique de l'infection. En effet, même si chez quelques patients il est possible de visualiser des réponses T CD8⁺ spécifiques du VHC, la proportion de la population de lymphocytes T CD4⁺ est faible ou nulle lorsque des méthodes fonctionnelles (Diepolder et al., 1995, Takaki et al., 2000, Day et al., 2002, Rosen et al., 2002) ou de complexes tétramériques MHC classe II-

peptide VHC (Day et al., 2003) sont utilisées. On ne sait pas si les lymphocytes T CD4+ spécifiques du VHC sont présents mais ne sont pas fonctionnels, ou si ils sont absents (Bowen et al., 2005).

L'incapacité de cellules T VHC spécifiques à éradiquer le virus pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes non mutuellement exclusifs:

(1) Une présentation antigénique défective de la part des cellules dendritiques et des macrophages (Bain et al., 2001, Lee et al., 2001, Sarobe et al., 2002) pourrait conduire à une activation inefficace des lymphocytes T. La production de TNF- α et d'IL-12 par les DC semble réduites et ces diminutions sont corrélées avec de faibles réponses T (Anthony et al., 2004). Dans une autre étude cependant, le phénotype et la fonction des DC n'étaient pas altéré (Longman et al., 2004). D'autre part, l'évolution de l'infection par le VHC chez le chimpanzé semble indépendante de disfonctionnement des DC (Rollier et al., 2003). L'ensemble des données disponible ne permet donc pas d'établir clairement le rôle des DC dans la persistance virale.

(2) La persistance du VHC pourrait être dû aux mutations qui surviennent les parties qui codent pour des épitopes reconnus par la réponse de l'hôte. Chez des patients infectés chroniquement par le VHC, il a été constaté que des mutations empêchent la reconnaissance du peptide viral présenté aux lymphocytes T (Chang et al., 1997, Frasca et al., 1999, Kaneko et al., 1997, Tsai et al., 1998). Le fait que les mutations qui sont détectées dans le génome viral chez des patients restent « stables » et ne se diversifient pas, même après plusieurs années (Chang et al., 1997), a conduit à postuler l'hypothèse de l'apparition précoce de ces mutations au cours de l'infection. Cette hypothèse semblerait être valable chez le chimpanzé où les mutations qui surviennent pendant les premières 16 semaines de l'infection, persistent pendant des années (Erickson et al., 2001).

(3) Le disfonctionnement de cellules T. Il a été remarqué qu'après stimulation *in vitro* la capacité de prolifération, la cytotoxicité, et la production d'IFN- γ et de TNF- α est diminuée chez les individus infectés par le VHC. L'insuffisance de ces lymphocytes à répondre face à un stimulus d'activation (« stunned cells ») a été observé pendant la phase aiguë et chronique de l'infection par le VHC (Lechner et al., 2000, Gruener et al., 2001, Thimme et al., 2001, Urbani et al., 2002, Wedemeyer et al., 2002). Indépendamment de l'éradication ou pas du virus, ce disfonctionnement a été constaté chez tous les patients pendant les stades précoces de l'infection.

(4) Une maturation incomplète des cellules T CD8+ spécifiques pourrait contribuer aux difficultés du système immunitaire à éliminer le virus. La présence des marqueurs CD27 et

CD28 sur les lymphocytes T CD8+ spécifiques du VHC a suggéré l'arrêt de la maturation des ces lymphocytes à un stade précoce de leur différenciation (Appay et al., 2002, Urbani et al., 2002), ceci est par ailleurs le cas pour les lymphocytes T spécifiques du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Champagne et al., 2001).

(5) La fonction des lymphocytes T effecteurs pourrait être modulée négativement par des lymphocytes T suppresseurs. Parmi ces cellules figurent les lymphocytes T CD4+CD25+ dont la fréquence est augmentée chez les patients infectés chroniquement par le VHC. Ces cellules peuvent sécréter du TGF- β et de l'IL-10 et régulent négativement la production d'IFN- γ ainsi que la prolifération de lymphocytes T VHC spécifiques (Cabrera et al., 2004, Sugimoto et al., 2003). Un autre type de cellules capables d'inhiber la fonction de lymphocytes T CD8+ spécifiques du VHC a été détectée au niveau intrahépatique. Il s'agit de cellules T CD8+ qui, à travers la sécrétion d'IL-10, suppriment la production d'IFN- γ (Accapezzato et al., 2004).

(6) Le virus serait capable d'interagir avec les cellules T de l'hôte et de moduler leur fonction. Par exemple, la protéine Core peut reconnaître le récepteur du complément gC1qR exprimé sur la surface de cellules T, de DCs et de macrophages pour perturber l'activation cellulaire, la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ (Yao et al., 2001, Kittlesen et al., 2000).

Lymphocytes T non-classiques

La population V α 24+V β 11+ des cellules NKT qui reconnaît des antigènes glycolipidiques présentés par CD1d joue un rôle non négligeable dans les réponses immunitaires auto-immunes, anti-tumorales et anti-microbiennes (Godfrey et al., 2000, van der Vliet et al., 2004). Pendant l'infection par le VHC, la proportion de cette population NKT pourrait être diminuée dans le sang (Lucas 2003). Cependant, une telle modulation n'a pas été retrouvée dans d'autres études (Karadimitris et al., 2001, van der Vliet et al., 2005).

Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les cellules T $\gamma\delta$ intrahépatiques peuvent produire de l'IFN- γ et du TNF- α après activation via CD81 (Tseng et al., 2001). L'interaction entre la protéine E2 du VHC et CD81 sur les cellules T $\gamma\delta$ pourrait donc induire leur activation. De plus, les lymphocytes T $\gamma\delta$ (type V γ 9V δ 2) de patients infectés par le VHC et activés avec des antigènes non-peptidiques peuvent avoir une activité anti-répliquative à travers la sécrétion d'IFN- γ (Agrati et al., 2005). Ces cellules pourraient donc en théorie contribuer à la résistance au virus. Dans l'Hépatite C chronique, la proportion de cellules T $\gamma\delta$ (V δ 1) intrahépatiques qui produisent de l'IFN- γ serait corrélée au niveau d'inflammation du tissu hépatique (Agrati et al., 2001).

La réponse lymphocytaire B

En ce qui concerne la réponse humorale pendant l'infection par le VHC, les lymphocytes B produisent des anticorps dirigés contre le virus qui sont détectables 7 à 8 semaines après infection. Parmi ces anticorps, certains reconnaissent les protéines d'enveloppe E1 et E2. Il est ainsi possible que l'apparition de mutations dans la région hypervariable 1 (HVR1) de la partie amino-terminale de E2 puisse contribuer à l'échappement du VHC face à la réponse humorale (Farci et al., 1992, Lai et al., 1994, Chen et al., 1999, Pawlotsky et al., 1999, Polyak et al., 1998). Des anticorps dirigés contre des protéines structurales et non structurales sont aussi détectables chez une majorité des patients ayant progressé vers la chronicité (Rubin RA et al., 1994). Cependant, la recherche d'anticorps ne semble pas fiable pour la recherche d'infections passées car dans le cas d'infection résolues, la présence d'anticorps circulant anti-VHC n'est plus détectable plusieurs années après la résolution tandis que des cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques sont toujours présentes (Takaki A et al., 2000).

Bien qu'il semble que l'éradication du virus en l'absence de réponse humorale substantielle semble possible (Post JJ et al., 2004), des anticorps neutralisants pourraient jouer un rôle positif. Les premières descriptions d'anticorps neutralisants ont porté sur des anticorps anti-HVR1 de E2 (Farci P et al., 1996; Shimizu YK et al., 1996). Ces travaux ont montré qu'un sérum de lapin obtenu par immunisation avec un peptide HRV1 pouvait avoir un pouvoir neutralisant chez le chimpanze. Cet effet dépend de la souche virale utilisée.

Jusqu'à récemment, il n'y avait pas ou peu d'éléments laissant penser que l'on puisse prédire l'évolution de l'infection à partir du profil humorale des patients (Bartosch B et al., 2003a), en partie à cause des limitations dans la détection des anticorps neutralisants. Cependant, le développement récent de systèmes de pseudo-particules porteuses des protéines VHC E1/E2 et leur utilisation dans des tests d'infection *in vitro* a permis d'avancer dans l'analyse du potentiel neutralisant des anticorps anti-HCV (Bartosch B et al., 2003a, 2003b). Ainsi, dans ces systèmes, l'analyse de patients en phase aiguë infectés par une même souche VHC a permis de montrer que leur sérum pouvait soit faciliter, soit inhiber l'infection *in vitro* démontrant la présence d'anticorps neutralisants pendant la phase aiguë chez certains patients. De façon remarquable, une corrélation a été observée entre l'émergence d'un potentiel neutralisant et une réduction de la forte virémie initiale s'accompagnant d'un contrôle de la réplication virale. A l'inverse, les patients séro-convertis, mais dépourvus de réponse neutralisante, n'ont pas montré de contrôle de la virémie et leur sérum semble faciliter l'infection *in vitro* (Lavillette D et al., 2005).

En ce qui concerne une contribution des anticorps anti-VHC aux dommages cellulaires via par exemple la formation de complexes immuns, il n'existe pas de réponse claire à ce jour même si l'on soupçonne que dans le cas de l'hépatite virale B, des anticorps puissent participer à un certain niveau aux dommages cellulaires (Michalak I et al., 1995).

Chez la majorité des patients infectés par le VHC, les cellules B présentent un phénotype activé (CD69+ CD71+ CD86+). Etant donné que l'engagement de CD81 peut induire la prolifération de lymphocytes B naïfs (CD27-) en l'absence d'engagement du BCR, la protéine E2 du VHC pourrait contribuer via CD81 à l'activation des cellules B naïves chez les patients (Rosa et al., 2005). L'infection par le VHC est fréquemment associée avec l'apparition d'autres pathologies extra-hépatiques telles que la cryoglobulinémie et le lymphome B non Hodgkinien qui se caractérisent par la prolifération de lymphocytes B. Chez la plupart des patients qui ont une cryoglobulinémie, le type II est le plus fréquent (Mondelli et al., 2003). Quelques travaux ont montré une expansion de cellules B CD5+ au niveau périphérique et intra-hépatique chez des patients atteints d'Hépatite C chronique (Curry et al., 2000, Curry et al., 2003). Mais ceci n'a pas été confirmé par d'autres groupes (Ni et al., 2003).

Réponse immunitaire innée

Interférons de type I

Les IFN de type I (IFNs- α , IFN- β , IFNs- λ) jouent un rôle central dans l'immunité antivirale. Toutes les cellules de l'organisme sont capables de produire des IFN de type I en réponse à une infection virale. Ces IFNs sécrétés sont reconnus par les cellules voisines et induisent la synthèse de protéines qui freinent ou bloquent la réplication virale (Samuel et al., 2001, Weber et al., 2004). Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), sont des sources importantes d'IFN- α (Colonna et al., 2002; Diebold et al., 2003). La production d'IFN- β peut être initiée par les hélicases intracellulaires RIG-1 et MDA-5 qui détectent les ARN double brin produits pendant la réplication virale (Yoneyama et al., 2004, Andrejeva et al., 2004, Kato et al., 2005; Yoneyama et al., 2005). RIG-1 et MDA-5 lient IPS-1 (interferon-promoter stimulator 1") (Kawai 2005) qui active les kinases IKK ϵ et TBK-1 capables de phosphoryler le facteur de transcription IRF-3 (Fitzgerald et al., 2003). Ce dernier est responsable de la production d'IFN- β (Schafer et al., 1998). (**Figure 19**). IRF-7 est pour sa part impliqué dans l'activation de la transcription de l'IFN- α . Une autre voie d'induction des IFN de type I est celle des TLRs qui peuvent détecter l'ARN viral simple brin (TLR-7) ou double brin (TLR-3). Ces TLRs sont présents sur les cellules dendritiques; TLR3 sur les mDC et TLR7 sur les pDC (Iwasaki et al., 2004,

Alexopoulou et al., 2001). Après engagement, les TLRs recrutent des molécules adaptatrices telles que MyD88 (pour TLR-7 et TLR-9) ou TRIF (pour TLR-3) qui activent les voies de transcription des IFN de type I (**Figure 19**).

Les facteurs Janus kinase (JAK) sont les médiateurs de la réponse aux IFN de type I. Ils phosphorylent les facteurs de transcription STAT (Signal transducer and activator of transcription) (Levy et al., 2002). STAT-1 et STAT-2 recrutent IRF-9 pour former le complexe ISGF-3 (IFN-stimulated gene factor 3). Ce complexe est transloqué dans le noyau pour reconnaître la région ISRE (IFN-stimulated response elements) du promoteur des gènes induits par ces IFN (ISGs) (de Veer et al., 2001). Parmi les protéines induites qui possèdent une activité antivirale contre le VHC, il est possible de citer la PKR (double-stranded RNA activated protein, OAS (2'-5' oligoadenylate synthetase et ADAR (dsRNA specific adenosine deaminase). La voie JAK-STAT peut être régulée négativement par les protéines « SOCS » (Suppressor of cytokine signaling) ou « PIAS » (protein inhibitor of activated STAT) (Kubo et al., 2003, Shuai et al., 2005).

Le VHC peut perturber la voie de signalisation des IFN-I à plusieurs niveaux (Gale et al., 2005). La protéase NS3/4A empêche l'activation du facteur de transcription IRF-3 à travers le clivage de IPS-1 et TRIF ou l'interaction avec la kinase TBK-1 (Meylan et al., 2005, Li et al., 2005, Foy et al., 2003, Otsuka et al., 2005). La protéine Core peut inhiber la voie JAK-STAT à travers l'activation de SOCS ou de PIAS, par intermédiaire de la protéine phosphatase 2A (Bode et al., 2003, Duong et al., 2004). NS5A induit la production de la chemokine IL-8 qui interfère avec l'action de l'IFN- α (Khabar et al., 1997, Polyak et al., 2001). En plus, NS5A perturbe la voie OAS/RNase-L (Taguchi et al., 2004). Par ailleurs, la sensibilité face à l'action de la RNase-L dépend de la présence et du nombre de sites spécifiques de clivage reconnus par cette enzyme dans le génome du VHC et peut ainsi varier selon le génotype viral (Han et al., 2002). Le VHC intervient dans la régulation négative de l'activité de la PKR à travers ses protéines E2, NS5A et la région IRES (Taylor et al., 1999, Noguchi et al., 2001, Gimenez-Barcons et al., 2005, Vyas et al., 2003, Thimme et al., 2006).

La réponse NK

Plusieurs études ont observé une perturbation de l'activité cytotoxique ex vivo des cellules NK pendant l'infection chronique par le VHC (Corado et al., 1997; Lirussi, et al., 2002; Lin et al., 2004; Meier et al., 2005). Cependant, le potentiel cytotoxique de ces cellules semble normal dans des expériences de plus longue durée (Duesberg et al., 2001). La fonction effectrice des cellules NK pendant l'infection par le VHC pourrait en fait être inhibée par plusieurs mécanismes. L'interaction de la protéine d'enveloppe E2 du VHC avec CD81

exprimé sur la surface de cellules NK peut inhiber leur prolifération, la production de cytokines et la cytotoxicité (Pileri et al., 1998; Crotta et al., 2002; Tseng and Klimpel 2002). La voie de signalisation de l'interféron alpha, qui joue un rôle important dans l'activation des cellules NK, peut aussi être perturbée par le VHC. Etant donné qu'une augmentation de l'expression de molécules de classe I sur les hépatocytes a été documentée pendant l'Hépatite C chronique (Herzer et al., 2003, Van Thiel et al., 1994), l'interaction de ces molécules avec des récepteurs inhibiteurs (comme les KIRs) situés sur la surface de cellules NK pourrait aussi favoriser l'inhibition de ces dernières. Le fait que les molécules HLA-E soient stabilisées par le peptide Core₃₅₋₄₄ du VHC sur les hépatocytes infectés (Nattermann et al., 2005), peut également représenter une source d'inhibition via NKG2A exprimée sur les cellules NK. En comparaison avec des individus contrôles, les proportions de cellules circulantes CD56^{dim} et CD56^{bright} (par rapport aux cellules CD3-CD56+ totales), serait perturbées chez les patients (Meier et al., 2005). Nous reviendrons sur cet aspect dans les résultats.

Traitement de l'Hépatite virale C

Le traitement actuel est efficace chez 90% des patients dans la phase aiguë et chez 50% des patients en phase chronique. Si l'infection par le VHC est dépistée dès qu'elle survient, le traitement préconisé est la monothérapie par IFN- α (Pawlotsky et Duhneaux, 2004). Le traitement de référence de l'Hépatite C est basé sur l'IFN- α pégylé associé à la Ribavirine (bithérapie). Chez les individus infectés par le génotype 2 ou 3 du VHC, il est possible d'éradiquer définitivement l'infection après 24 semaines de ce traitement. Par contre, dans le cas des autres génotypes, le traitement est efficace dans la moitié des cas seulement, même si le traitement est prolongée jusque à 48 semaines (Pawlotsky et Duhneaux, 2004). La Ribavirine est un analogue de la guanosine qui après phosphorylation, peut être incorporé à l'ARN viral par l'ARN Polymerase, interrompre la synthèse d'ARN et inhiber la réplication virale. La ribavirine interfère aussi avec la production de GTP qui est nécessaire à la réplication virale et elle pourrait avoir un effet immunomodulateur en favorisant les réponses cellulaires du type Th1. (**Figure 20**). Quant à l'IFN- α , il induit la synthèse de protéines antivirales mais il peut aussi favoriser la réponse cellulaire Th1, l'activation de cellules NK, et la maturation de cellules dendritiques. (Feld et al., 2005) Les mécanismes de l'efficacité du traitement ne sont pas complètement élucidés mais ils pourraient ainsi être associés avec le développement de réponses cellulaires T HCV spécifiques accompagnées d'une augmentation de la production d'IFN- γ et une diminution de la production d'IL10, IL-4 et IL-5 (Cramp et al., 2000, Kamal et al., 2002). Des essais cliniques sont en cours pour tester l'efficacité

d'inhibiteurs de la protéase NS3-4A et de la ARN polymerase, NS5B. Des ligands pouvant activer les voies des TLR-7 et TLR-9 et induire la sécrétion d'IFN- α , sont à l'étude (De Francesco 2005)(**Tableau VI**). Même si à l'heure actuelle il n'y a pas de vaccin disponible contre le VHC (Houghton et al., 2005), une étude récente où un vaccin contre le VHC a été testé chez le chimpanzé a donné des résultats encourageants (Folgori et al., 2006).

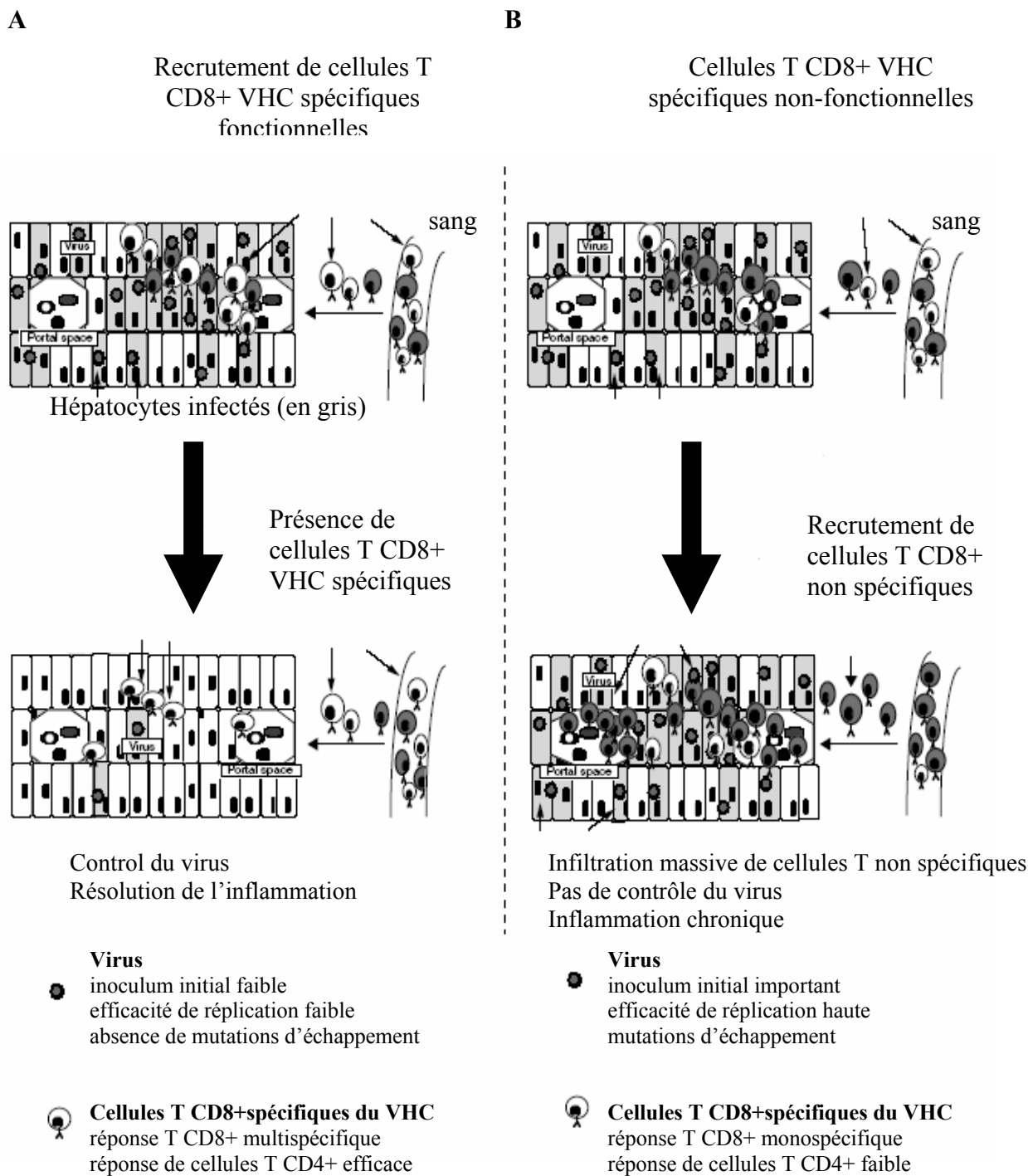


Figure 14 : Représentation schématique des modèles actuels décrivant la résolution (A) et l'évolution vers la chronicité (B) de l'infection par le VHC. (D'après Bertoletti et al., 2000).

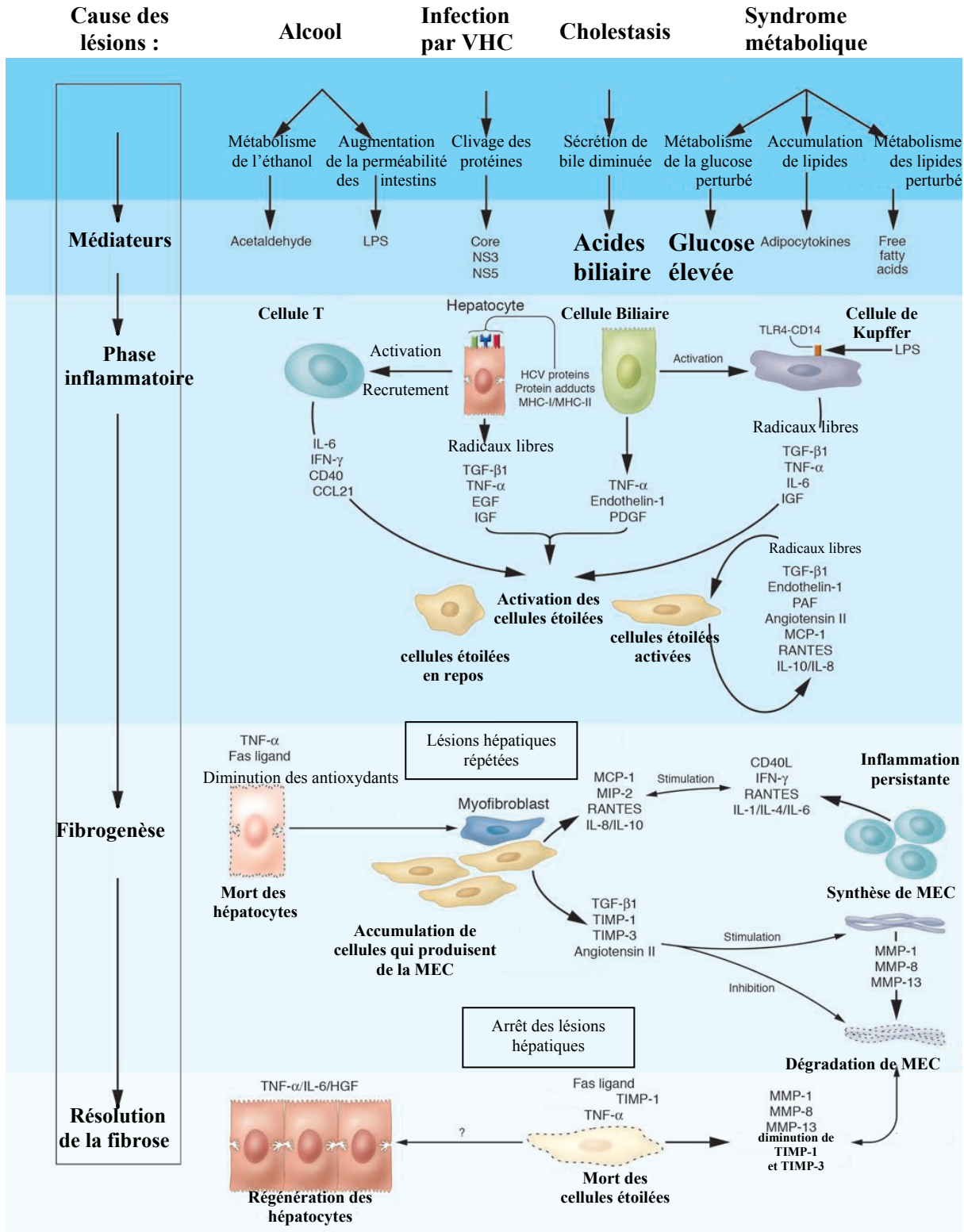
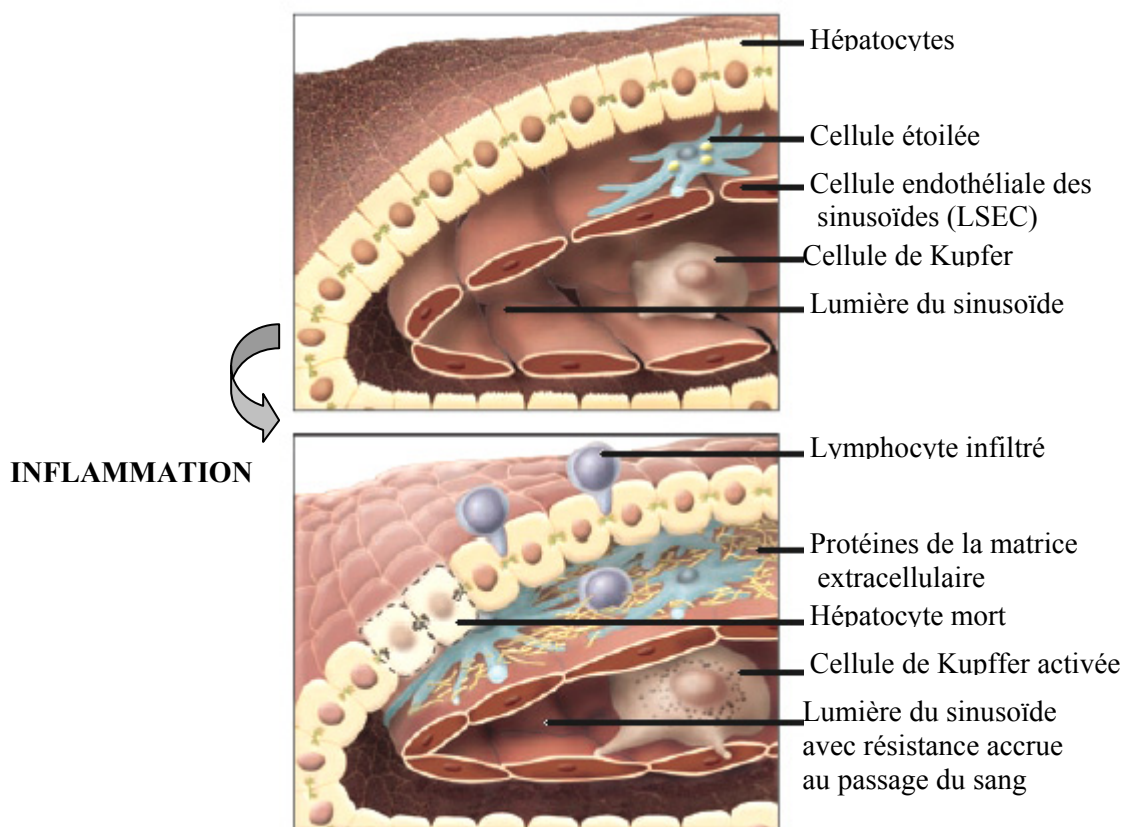


Figure 15 (ci contre): Physiopathologie du foie : mécanismes cellulaires.

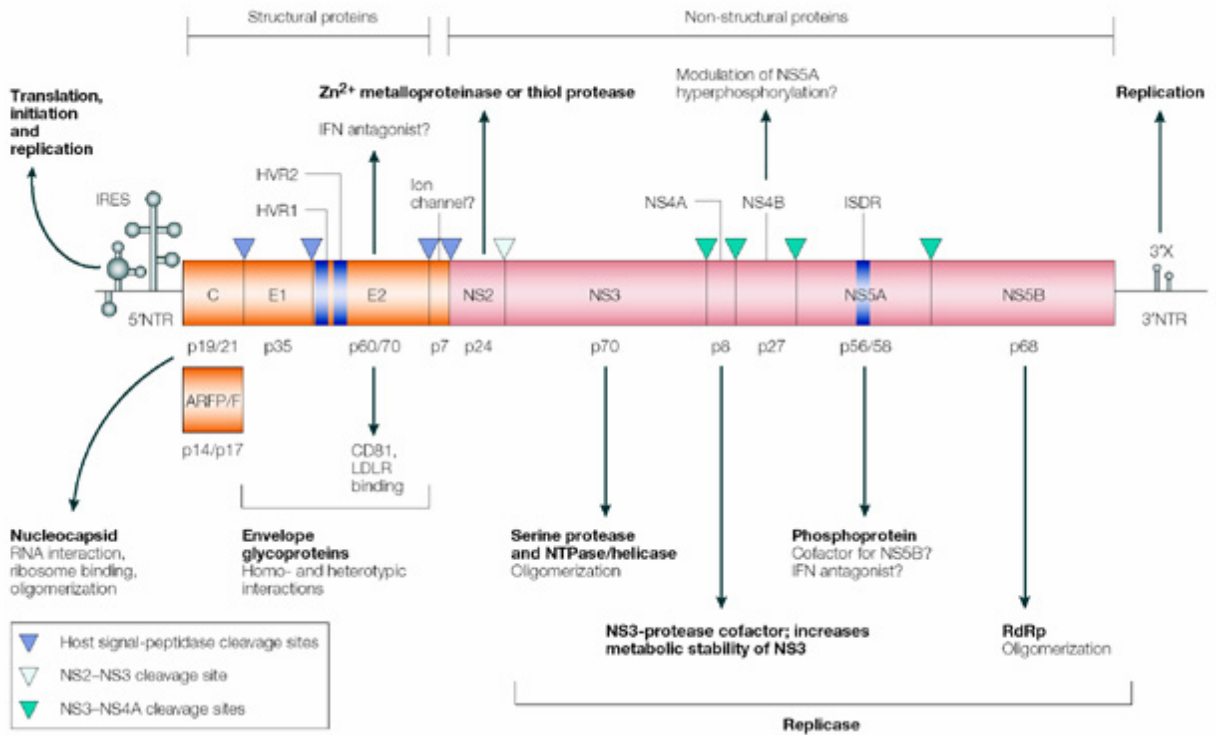
Plusieurs causes dont l'infection par le VHC peuvent initier l'inflammation du tissu hépatique. Les hépatocytes ainsi que les cellules biliaires produisent des cytokines et des facteurs solubles qui activent les cellules de Kupffer et recrutent des lymphocytes T. Cet environnement inflammatoire provoque l'activation des cellules étoilées qui commencent à produire des cytokines à leur tour. Si les lésions du tissu hépatique sont répétées, il y a production continue de grandes quantités de protéine de matrice extracellulaire (MEC). Ceci conduit à la fibrose. La dégradation de la MEC est inhibée par des inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMPs). Si la cause des lésions est éradiquée, la fibrose régresse. Cette phase inclue la mort des cellules étoilées activées et la régénération des hépatocytes. Le collagène est dégradé par l'action de métalloprotéinases (MMPs).

CCL21 : C-C chemokine ligand 21, MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1, MIP-2: macrophage inflammatory protein-2, PAF : platelet-activating factor, LPS: lipopolysaccharide, TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase, TGF : Transforming growth factor, MMP : matrix metalloproteinase, HGF : hepatocyte growth factor, PDGF : platelet-derived growth factor, EGF : endothelial growth factor, IGF : insulin growth factor. (D'après Bataller et Brenner, 2005).

**Figure 16 : Changement de l'architecture du foie suite à l'inflammation chronique.**

Comme conséquence de l'inflammation chronique du foie les lymphocytes vont infiltrer le parenchyme hépatique. Certains hépatocytes vont subir un processus de mort cellulaire. Les cellules de Kupffer s'activent et libèrent de substances qui favorisent la production de fibres. Les cellules étoilées prolifèrent et s'activent en sécrétant des importantes quantités de protéines de la matrice extracellulaire. Les cellules endothéliales perdent leur « fenestrations » et le sinusoides augmente sa résistance face au passage de la circulation sanguine. (D'après Bataller et Brenner, 2005).

A



B

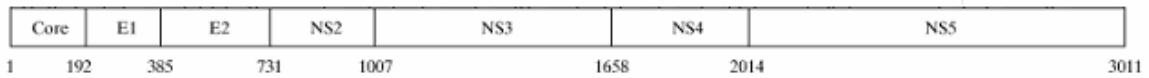
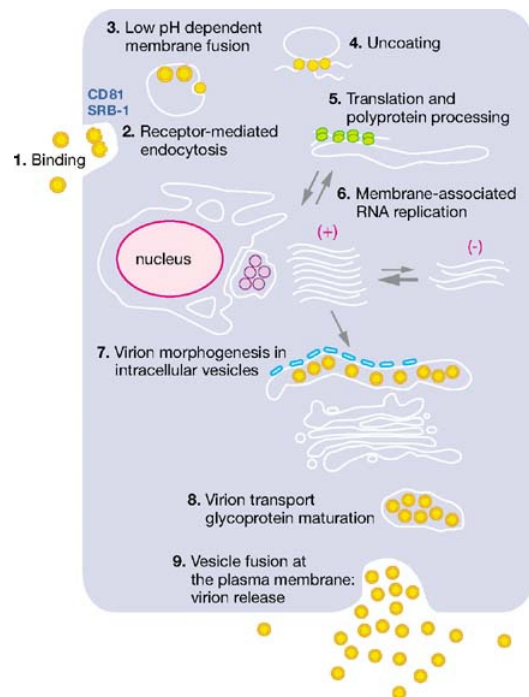


Figure 17 : Organisation du génome ARN du VHC, de la polyprotéine virale et fonctions des protéines virales (A) et carte de la polyprotéine (B).

(D'après www.postech.ac.kr/dept/life/mv1/icons/hcv.jpg).

Figure 18 : Cycle de réplication du VHC.

(1) liaison au(x) récepteur(s), (2) endocytose récepteur dépendante, (3-4) libération dans le cytoplasme, (5) synthèse et apprêtement de la polyprotéine, (6) réplication du RNA en zones membranaires, (7) assemblages de virions au sein de vésicules, (8) maturation et (9) libération de virions par fusion membranaire. (D'après Guidotti et Chisari *Annu. Rev. Pathol.* 2006).



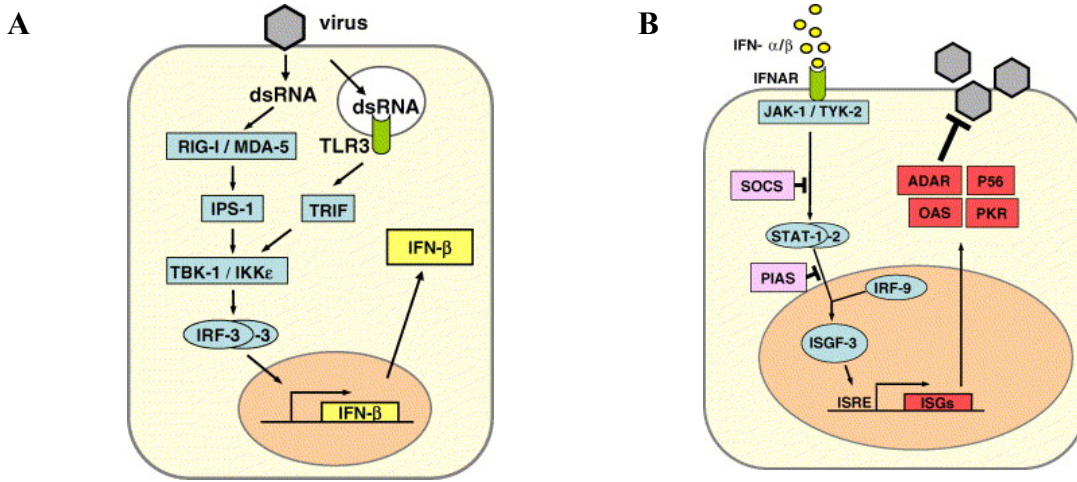


Figure 19: IFNs de type I et infection virales.

A) Induction des IFNs de type I. La détection des ARN double brin (dsRNA) par RIG-I, MDA5 et/ou TLR3 conduit à l'activation du facteur de transcription IRF-3 via IPS-1/IKKε/TBK-1 et TRIF respectivement. B) Réponse cellulaire aux IFNs de type I. Après liaison au récepteur spécifique (IFNAR), les IFNs de type I induisent l'expression de nombreux gènes via la voie JAK/STAT. Les molécules ADAR, P56, OAS et PKR sont des molécules antivirales participant à la résistance contre le VHC. SOCS et PIAS peuvent moduler les signaux induits par les IFNs de type I. (D'après Thimme et al., 2006).

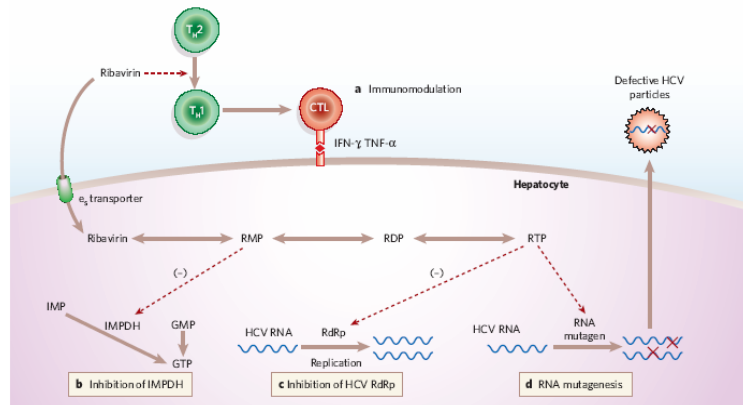


Figure 20 : Mécanismes possibles de l'action de la Ribavirine sur l'infection par leVHC. a : immunomodulation par promotion de réponse Th1, b :déplétion en GTP, c :inhibition de l'activité RNA polymérase, d : mutagenèse altérant l'efficacité des virions. (D'après Feld et al., 2005)

Tableau IV: Epitopes VHC reconnus par des LT CD4+ spécifiques circulants chez les patients avec Hépatite C aiguë. (D'après De Gerlach et al., 2005).

Localisation	Séquence	Fréquence de patients (%) avec réponse T contre l'épitope
NS3	1242-1261	40
	1388-1407	45
	1406-1425	40
	1450-1469	30
	1535-1554	40
	1575-1594	40
1585-1604	50	
NS4	1665-1674	30
	1765-1784	30
	1775-1794	55
	1805-1824	40
	1905-1924	30
	1955-1974	30
		30

Tableau V: Epitopes VHC reconnus par des LT CD8+ spécifiques.

Protéine VHC	Positions	Restriction HLA	Séquence							
Core	35 – 44	A2	YLLPRRGPRLL, YLLPSRGPKL	NS3	1406 – 1415	A2	KLVALGINAV, KLSGLGINAV,			
	90 – 98	A2	GLGWVWLL			A2	KLVS LGVNAV,			
	132 – 140	A2	DLMGYIPLV, ALMGYIPLV, DLMGYIPAV			A2	KLSGLGLNAV, KLVALGVNAV			
	131 – 140	A2	ADLMGYIPLV			1585 - 1593	A2	YLVAYQATV		
	156 – 165	A2	RVLEDGVNYA			1031 – 1039	A24	AYSQQTRGL		
	177 – 185	A2	FLALLSCL			1069 – 1077	B35	LPGCSFSIF		
	178 – 187	A2	LLALLSCLTV, LLALLSCLTI			1100 – 1108	A24	MYTNVDQDL		
	1 – 9	A11	MSTNPKPQK			1261 – 1270	A3	TLGFGAYMSK		
	2 – 9	A11	STNPKPQK			1262 – 1270	B35	LGFGAYMSK		
	28 – 36	B60	GQIVGGVYL			1359 – 1367	B35	HPNIEEVAL		
	41 – 49	B7	GPRLGVRAT			1391 – 1399	A3	LIFCHSKKK		
	43 – 51	A3	RLGVRATRK			1395 – 1403	B8	HSKCKCDEL		
	51 – 59	A3	KTSERSQPR			1402 – 1410	B8	ELAAKLVL		
	88 – 96	B44	NEGCGWMGW			1531 – 1539	B35	TPAETTURL		
	111–119	B7	DPRRRSRNL			1611 – 1618	B8	LIRLKPPL		
	169–177	B7	LPGCSFSIF			1636–1643	A11	TLTHPVTK		
	E1	220 – 227	A2			ILHTPGCV	NS4	1661 – 1669	A2	VLVGGVLAA
		257 – 266	A2			QLRRHIDLLV, QLRRHIDLLV		1666 – 1675	A2	VLAALAAAYCL
		285 – 293	A2			FLVSQLFTF		1769 – 1777	A2	HMWNFISGI
363 – 371		A2	SMVGNWAKV	1789 – 1797	A2	SLMAFTAAV, SLMAFTASV				
398 – 407		A2	SLASLFTQGA	1807 – 1816	A2	LLFNILGGWV, VFFNILGGWV				
234 – 242		B35	NASRCWVAM	1851 – 1859	A2	ILAGYGAGV				
289 – 297		A3	QLFTFSPRR	1915 – 1923	A2	WMNRLIAFA				
401 – 411		A2	SLLAPGAKQNV	1987 – 1995	A2	VLDSFKTWL				
614 – 622		A2	RLWHYPCTV	1744 – 1754	A25	EVIAPAVQTNW				
686 – 694		A2	ALSTGLIHL	1758 – 1766	A25	ETFWAKHMW				
E2	723 – 732	A2	LLFLLADA	1858 – 1867	A3	GVAGALVAFK				
	725 – 734	A2	FLLLADARV	1859 – 1867		VAGALVAFK				
	460 – 469	B53	RPLTDFDQGW	1941–48	B38	AARVTAIL				
	489 – 496	B51	YPPKPCGI	1966–76	B37	SECTTPCSGSW				
	497 – 507	B35	VPASQVCGPVY	2000–2008	B35	LPKLPGVPF				
	530 – 539	B60	GENDTDVFLV							
	569 – 578	B50	CVIGGAGNNT							
	621 – 628	A11	TINYTIFK							
	632 – 641	A3	RMYVGGVEHR							
	654 – 662	B60	LEDRDRSEL							
NS2	827– 834	A29	MALTLSPY	NS5	2141 – 2149	A2	LLREEVSFRV			
	831– 840	A25	LSPYYKRYIS		2221 – 2231	A2	SPDAELIEANL			
	838 – 845	A23	YISWCLWW		2252 – 2260	A2	ILDSFDPLV			
	838 – 846	A23	YISWCLWWL		2578 – 2587	A2	RLIVFPDLGV			
	957–964	B37	RDWAHNGL		2594 – 2602	A2	ALYDVVTKL			
NS3	1073 – 1081	A2	CINGVCWTV, CVNGVCWTV, CVVGVCWTA	2727 – 2735	A2	GLQDCTMLV, GLQDCTMFV				
	1131 – 1139	A2	YLVTRHADV	2152 – 2160	B60	HEYPVGSQV				
	1169 – 1177	A2	LLCPAGHAV, LLCPSGHVV	2161 – 2171	B35	PCEPEPDVAVL				
	1287 – 1296	A2	TGAPVITYSTY	2163 – 2171	B35	EPEPDVAVL				
		A2		2218 – 2226	B38	NHDSPEAEL				
		A2		2225 – 2233	A25	ELIEANLLW				
		A2		2266 – 2275	B60	REISVPAEIL				
		A2		2510 – 2518	A3	SLTPPHSAK				
		A2		2588 – 2596	A3	RVCEKMALY				
		A2		2629 – 2637	B57	KSKKTPMGF				
	A2		2794 – 2802	A3	HDGAGKRVY					
	A2		2794 – 2804	B38	HDGAGKRVYYL					
	A2		2819 – 2828	A25	TARHTPVNSW					
	A2		3003 – 3011	A31	VGIYLLPNR					

(D'après Ward et al., 2002).

Tableau VI : Molécules en essai clinique, pour le traitement de l'Hépatite C

Molécule	Source	Phase clinique	Cible	Mécanisme d'action
<u>Cible: VHC</u>				
BILN 2061 (Ciluprevir)	Boehringer-Ingelheim	Phase II*	Protease NS3-4A	Inhibiteur de serine protéase
VX-950	Vertex/Mitsubishi	Phase Ib	Protease NS3-4A	Inhibiteur de serine protéase
NM283 (Valopicitabine)	Idenix/Novartis	Phase II	Polymerase NS5B	analogue de nucleoside
JTK-103	Japan Tobacco	Phase II	Polymerase NS5B	Inhibiteur allostérique -non nucléoside-
HCV-796	ViroPharma/Wyeth	Phase Ia	Polymerase NS5B	Inhibiteur allostérique -non nucléoside-
*Arrêté dû à des effets toxiques chez le chimpanzé				
<u>Cible: hôte</u>				
Actilon (CpG-10101)	Coley Pharmaceutical Group	Phase Ib	Toll-like receptor-9	Immunomodulateur
ANA245 (Isatoribine)	Anadys Pharmaceuticals	Phase Ib	Toll-like receptor-7	Immunomodulateur
ANA975	Anadys Pharmaceuticals	Phase Ia	Toll-like receptor-7	Immunomodulateur

(D'après Feld et al., 2005).

Matériels et Méthodes

MATERIELS ET METHODES

Patients et individus contrôles.

Les patients atteints d'Hépatite virale C chronique qui ont fait partie des études réalisées pendant cette thèse, ont été recrutés au Service d'Hépatogastroentérologie du CHU de Grenoble (Pr. J.P. Zarski et Dr. V. Leroy). Les caractéristiques épidémiologiques et cliniques sont montrées dans les tableaux des manuscrits de la partie résultats. Les patients ont signé un consentement écrit et leur participation a été approuvée par le Comité Local d'Ethique. Les patients étaient positifs pour la présence d'ARN du VHC (PCR quantitative, Amplicor HCV, Roche Diagnostic Systems, Meylan, France) ce qui constitue le premier marqueur de l'infection par le VHC, et la présence d'anticorps anti-VHC (ELISA 3^e génération, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA). Le génotype du VHC a été déterminé avec le kit Inno-Lipa (Innogenetics, Zwijnaarde, Belgique). Les patients n'étaient infectés ni par le VIH ni par le VHB. Ils étaient normaux en terme de marqueurs biochimiques d'Hépatite auto-immune. Les patients n'avaient pas reçu de traitement antiviral au moment de la biopsie intrahépatique ou du prélèvement de sang. Les prélèvements de sang périphérique de sujets normaux ont été réalisés à l'Etablissement Français du Sang (EFS) de La Tronche.

Informations sur les paramètres cliniques de la maladie.

Outre les informations sur la charge virale, nous avons utilisées les données de laboratoires sur l'élévation du taux sérique des enzymes hépatiques (transaminases). Ce taux est le plus souvent très supérieur à la normale en phase aiguë même si des valeurs basses sont parfois également observées. En phase chronique, les transaminases peuvent se normaliser ou rester sensiblement élevées. Enfin, nous avons utilisé les résultats d'analyses de la ponction biopsie hépatique (PBH). La PBH est un examen permettant de distinguer une hépatite chronique modérée ou avancée d'une hépatite chronique légère. Cet examen permet d'établir ce que l'on appelle le score Métavir qui révèle l'activité liée à la nécrose et à l'inflammation due à la présence du virus, et aussi la fibrose du tissu hépatique. Les niveaux du score Métavir peuvent se résumer ainsi:

	Nécrose/Inflammation	Fibrose
Absence	A0	F0
Présence minimale	A1	F1
Présence modérée	A2	F2
Présence sévère	A3	F3
Présence de cirrhose		F4

Isolement des cellules mononuclées périphériques.

Les prélèvements de sang périphérique ont été recueillis en présence d'héparine. La méthode du Ficoll-Hypaque a été utilisée par la suite pour isoler les mononucléaires. Selon cette procédure, la densité caractéristique de différentes populations détermine, après centrifugation, leur localisation différentielle. Tandis que les polynucléaires et les hématies sont culottées, les cellules mononuclées, dont les lymphocytes, forment un anneau à l'interface milieu aqueux-milieu de séparation.

Extraction des lymphocytes intrahépatiques

La biopsie hépatique est en premier lieu destinée à l'analyse histo-pathologique réalisée au CHU de Grenoble, une autre partie est réservée à la conservation au CHU de Grenoble (« tissuthèque »), enfin, la troisième partie a été utilisée pour extraire les lymphocytes intrahépatiques. La méthode d'extraction des lymphocytes intrahépatiques qui utilise principalement une disruption mécanique du tissu, a été choisie en raison des immunomarquages et des techniques de cytométrie en flux utilisées par la suite. Une étude a en effet montré que les méthodes d'extraction qui incluent des solutions enzymatiques (telles que la collagenase et la DNase) pour dissocier le tissu hépatique et pour en extraire les cellules, provoquent une diminution de l'expression de molécules telle que CD56 (Curry et al., 2000). Dans la pratique, si pour isoler les lymphocytes intrahépatiques, la méthode enzymatique était choisie, la diminution de la détection de CD56 pourrait conduire à une estimation erronée de la fréquence de la population de cellules NK (définies comme étant CD3 négatives et CD56 positives). Pour extraire les cellules mononuclées intrahépatiques, le fragment de biopsie a été transféré dans du milieu frais RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de sérum AB humain et lavé (agitation sur un agitateur de plaques pendant 30') pour enlever toute contamination de sang périphérique survenue au moment de la ponction hépatique. Une fois lavée, la biopsie a été transférée dans un « potter » en verre avec du milieu frais pour effectuer une dissociation mécanique du tissu hépatique. La suspension cellulaire a été centrifugée et le culot de cellules remis en suspension dans du milieu avant d'effectuer les immunomarquages ou d'autres analyses. Dû au faible nombre total de cellules obtenu à partir d'une biopsie (de l'ordre de 4 à 500 000 cellules), celle-ci était en général divisée en quatre au maximum (un nombre supérieur conduisant en général à des analyses de moindre qualité car les lymphocytes ne représentent qu'une fraction de ce nombre total).

Expansion *in vitro* des cellules isolées des patients.

Après numération, les cellules circulantes ou intrahépatiques ont été remises en suspension dans du milieu contenant 10 % de sérum AB humain inactivé, 1 % L-glutamine, 1 % pénicilline/streptomycine, 1 % Na pyruvate, 1 % acides aminés non essentiels (Sigma), du bêta mercaptoéthanol, et mis en culture à 37°C/5 % CO₂ en plaque 96 puits (0.1 x 10⁶/puits) en présence de PBMC autologues irradiés (3000 rad) (0.1 x 10⁶/puits), d'interleukine-2 (IL-2) humaine (100 U/ml) et de phytohémagglutinine (PHA) (2µg/ml). Le milieu a été renouvelé tous les trois jours avec IL-2 mais sans PHA puis, à confluence, les puits ont été repiqués en plaque 24 puits plusieurs fois durant l'expansion. Au bout de trois à quatre semaines, les cellules ont été utilisées et/ou cryo-préservées.

Immunomarquages et cytométrie de flux.

Pour les immunomarquages, entre 0.1 et 1 x 10⁶ cellules (selon le type d'échantillon) isolées à partir du sang périphérique ou du tissu hépatique, ont été incubées 30 minutes à 4°C dans l'obscurité en présence de quantités saturantes d'anticorps conjugués à différents fluorochromes et dirigés contre des molécules de surface. Deux lavages avec du tampon PBS (phosphate buffered saline) contenant 3% de sérum (tampon de marquage) ont été faits avant l'analyse par cytométrie en flux. Pour les marquages indirects, les cellules ont d'abord été incubées avec un anticorps primaire non-conjugué et après lavage, incubées avec un fragment F(ab')₂ de chèvre anti-Immoglobuline de souris conjugué au FITC (Fluorescein isothiocyanate). Pour les marquages intracellulaires, les cellules ont d'abord été marquées avec les anticorps dirigés contre les molécules de surface et ensuite perméabilisées (tampon Cytotfix/Cytoperm, BD), lavées (tampon Perm/Wash) marquées pour la molécule intracellulaire d'intérêt durant 15 mn à 4°C puis lavées deux fois.

Les analyses multi-paramétriques de cytométrie en flux ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre permettant les analyses à quatre couleurs (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA : FL-1: FITC ; FL-2: PE + IP ; FL-3: PE/Cy5 + IP ; FL-4: APC) à l'aide du logiciel CellQuest (Becton Dickinson). Les cellules mortes ont été exclues par sélection électronique en présence d'iodure de propidium (IP) ou en fonction des paramètres de taille et de granularité (FSC et SSC). Les compensations nécessaires pour les différents fluorochromes ont été faites avec des cellules marquées séparément pour chaque fluorochrome. Selon les conditions, entre 20 000 et 200 000 événements étaient acquis. Les anticorps principalement utilisés sont recensés dans le tableau ci après.

Principaux anticorps monoclonaux utilisés

Spécificité de l'Anticorps	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
<u>Populations :</u>			
CD3	(PE)Cy5	UCHT1	BD
CD8 α	FITC	SK1	BD
CD8 α	APC	B9.11	BC
CD56	PE	NCAM16.2	BD
<u>Récepteurs NK:</u>			
CD158a,h	-	EB6	BC
CD158a,h	PE	EB6	BC
CD158a,h	APC		BC
CD158b1,b2,j	-	GL183	BC
CD158b1,b2,j	PE	GL183	BC
CD158b1,b2,j	APC		BC
CD158b2/KIR2DL3	-	180701	R&D
NKG2A(CD159A)	-	Z199	BC
NKG2A(CD159A)	PE	Z199	BC
NKG2A(CD159A)	APC	131411	R&D
CD94	PE	HP3B1	BC
CD85j/LIR1	PE	GHI/75	BD
CD85j/LIR1	FITC	GHI/75	BD
<u>Activation/ Differentiation:</u>			
CD27	FITC	M-T271	BD
CD28	FITC	CD28.2	BD
CD57	FITC	NK-1	BD
CD45RA	FITC	HI100	BD
CD45RO	FITC	UCHL1	BD
CD62L	FITC	FMC46	Serotec
<u>Autres :</u>			
Perforine	FITC	δ G9	BD
Granzyme B	FITC	GB11	BD
Bcl-2	FITC	Bcl-2/100	BD
HLA-A2	FITC	BB7.2	BD
Mouse Ig	FITC	F(ab') ₂	Jackson ImmunoResearch

BD : Becton Dickinson, BC : Beckman Coulter, PE : Phycoerythrine, Cy5: Cyanine 5, FITC: Fluorescein Isothiocyanate, APC : allophycocyanine

Populations cellulaires étudiées.

Dans nos études, les différentes populations cellulaires étudiées ont été définies selon l'expression des molécules suivantes.

Population	Molécules
Lymphocytes T	CD3+
Lymphocytes T CD8+	CD3+CD8 ^{bright}
Cellules NK	CD3-CD56+
Cellules NK CD56 ^{dim}	CD3-CD56 ^{dim}
Cellules NK CD56 ^{bright}	CD3-CD56 ^{bright}
Cellules NK CD8	CD3-CD8 ^{low}

Multimères de complexes peptide VHC:HLA classe I.

Des composés multimériques recombinants formés par des complexes de molécules HLA-A*0201 associées à des peptides de protéines du VHC et conjugués à un fluorochrome ont été utilisés pour visualiser les cellules T CD8+ spécifiques d'antigènes du VHC qui expriment certains récepteurs à leur surface. Ces complexes de multimères HLA classe I :peptide VHC proviennent de Proimmune Limited (Oxford, Angleterre) et les marquages associés à d'autres immunomarquages ont été faits en suivant les instructions fournies. Ces réactifs ont été utilisés en cocktail en raison de la faible fréquence des cellules spécifiques du VHC. L'identité des peptides de protéines du VHC associés à HLA-A*0201 utilisés pour la détection de cellules T CD8+ spécifiques est indiquée ci après.

Protéine VHC	Localisation	Séquence*
NS3	1073-1081	CINGVCWTV
NS3	1406-1415	KLVALGINAV
NS5	2594-2602	ALYDVVTKL

* Code à une lettre des amino-acides.

Détection de cellules ayant engagé un programme de mort cellulaire.

Occasionnellement, la recherche d'évènement d'apoptose parmi les populations examinées a été faite par cytométrie de flux à l'aide de marquage à l'annexine V-FITC (BD Bioscience) en présence de calcium. Les analyses ont été faite en présence d'iodure de propidium.

Dosage de cytokines par ELISA

Lorsque nécessaire, le dosage de cytokines présentes dans le surnageant de culture a été réalisé par la méthode ELISA selon une procédure standard au moyen d'anticorps de capture purifiés et d'anticorps de détection couplés à la peroxidase (BD Bioscience). Les complexes ont été détectés à l'aide de tétraméthylbenzidine en présence de peroxyde d'hydrogène. La lecture a été réalisée à 450 nm sur un lecteur Titertek Multiscan +.

Extraction des ARN totaux et synthèse des ADN complémentaires (ADNc).

Les ARN totaux des cellules de patients et d'individus contrôles ont été préparés par extraction à l'aide du réactif RNA-Now (Biogentex-Ozyme) selon les instructions du fournisseur. 1 à 5 µg d'ARN total ont été utilisés pour la synthèse des ADNc correspondants par transcription inverse (RT) en présence d'oligo(dT)₁₂₋₁₈, de dithiothreitol, d'inhibiteur de ribonucléases et de la Transcriptase Reverse SuperScript II (Life Technologies) à 42°C pendant 50 minutes sous 20 µl.

Analyse du répertoire des récepteurs KIR par réaction de PCR.

Le principe de réaction de polymérisation en chaîne en présence d'amorces spécifiques des séquences des gènes KIRs (PCR-SSP) a été utilisé pour rechercher plusieurs récepteurs KIRs (activateurs et inhibiteurs) exprimés chez les patients et chez des donneurs sains. Les oligonucléotides sens et anti-sens spécifiques des gènes KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1 et KIR2DL4 ont été décrits précédemment par Uhrberg et al., qui ont montré que l'analyse par RT-PCR est équivalente à une analyse faite sur ADN génomique et donc que les gènes KIR présents sont tous exprimés (Uhrberg et al., 1997). Les réactions PCR ont été réalisées au moyen d'un thermo-cycleur Perkin-Elmer dans 25 µl de tampon de réaction en présence de dNTPs (0.2 mM), d'amorces (12 pMoles) et d'enzyme Taq polymérase (0.5 U)(Perkin-Elmer) selon les conditions suivantes : 94°C pour 2 min, puis 1 min à 62°C et 45 s à 72°C, pour 5 cycles puis 94°C for 1 min, 45 s à 60°C, 45 s à 72°C pour 25 cycles. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium et visualisés par trans-illumination sur table UV. La table ci jointe rassemble les informations sur les oligonucléotides utilisés.

Séquence des oligonucléotides utilisés pour l'analyse du répertoire des récepteurs KIR.

KIR		Séquence
KIR2DL1	Sens	GCA GCA CCA TGT CGC TCT
	Anti-Sens	GTC ACT GGG AGC TGA CAC
KIR2DL2	S	CCA CTG CTT GTT TCT GTC AT
	A-S	CAG CAT TTG GAA GTT CCG C
KIR2DL3	S	CCA CTG AAC CAA GCT CCG
	A-S	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA
KIR2DL4	S	CTG TCC CTG AGC TCTA CAA
	A-S	CAC TGA GTA CCT AAT CAC AG
KIR3DL1	S	ACA TCG TGG TCA CAG GTC C
	A-S	TGC GTA TGT CAC CTC CTC
KIR3DL2	S	CGG TCC CTT GAT GCC TGT
	A-S	GAC CAC ACG CAG GGC AG
KIR2DS1	S	TCT CCA TCA GTC GCA TGA A
	A-S	AGG GCC CAG AGG AAA GTT
KIR2DS2	S	TGC ACA GAG AGG GGA AGT A
	A-S	CAC GCT CTC TCC TGC CAA
KIR2DS3	S	TCA CTC CCC CTA TCA GTT T
	A-S	GCA TCT GTA GGT TCC TCC T
KIR2DS4	S	CTG GCC CTC CCA GGT CA
	A-S	GGA ATG TTC CGT TGA TGC
KIR2DS5	S	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C
	A-S	GCC GAA GCA TCT GTA GGC
KIR3DS1	S	GGC ACC CAG CAA CCC CA
	A-S	AAG GGC ACG CAT CAT GGA

Analyses statistiques.

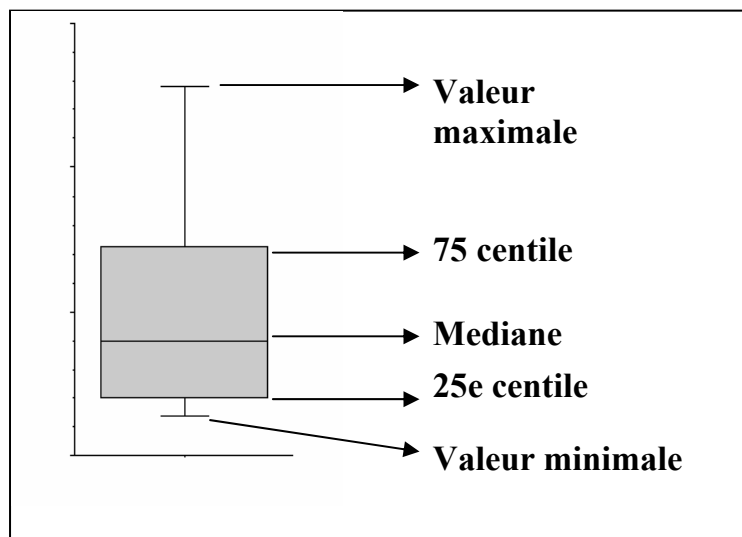
Le test dit de Mann-Whitney a été utilisé pour analyser les comparaisons entre patients et sujets contrôles (par exemple afin de déterminer si les fréquences de cellules T exprimant des récepteurs NK, étaient significativement différentes entre les deux groupes). Le test de Wilcoxon a été utilisé pour analyser les comparaisons de fréquences de cellules entre deux compartiments différents chez les mêmes individus (notamment les fréquences de cellules T qui expriment des récepteurs du type NK entre la périphérie et le foie des patients). Pour ce test, seuls les individus pour lesquels les valeurs périphérique et intrahépatique étaient disponibles, ont été inclus. Ces tests ont été utilisés car les tests non-paramétriques sont appropriés lorsque la taille des populations analysées est petite, lorsque la taille de deux populations à analyser est différente ou lorsque la nature de la distribution n'est pas connue. Le test exact de Fisher a été utilisé pour comparer les fréquences de différents KIRs entre patients et contrôles. Les analyses statistiques des résultats ont été faites avec les programmes

SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) ou bien Statview version 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC). Pour évaluer le degré de corrélation entre deux variables le coefficient de Spearman a été utilisé (voir tableau). Toutes les comparaisons étaient bilatérales. Les valeurs de p de moins de 0.05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Degrés de corrélation.

Coefficient r + ou -	Type de corrélation
1	Parfaite
0.8 à 0.98	Forte
0.5 à 0.75	Modérée
0.25 à 0.45	Faible
0.1 à 0.2	Négligeable

Les graphes de type « box-plot » ont parfois été utilisés pour illustrer la distribution des valeurs obtenues. Le box-plot (ou boîte à moustache) donne cinq informations principales: la valeur de la médiane, la valeur la plus faible, la valeur la plus élevée, le 25^e centile (ou premier quartile, où se situent 25% de valeurs) et le 75^e centile (ou troisième quartile, qui comprennent 75% des valeurs).



Résultats

Article 1

Features and Distribution of CD8 T cells with HLA Class I Specific Receptor Expression in Chronic Hepatitis C.

Paula Bonorino, Vincent Leroy, Martine Pernollet, Eric Vivier, Jean-Pierre Zarski, Patrice N. Marche and Evelyne Jouvin-Marche.

Soumis pour publication.

Analyse des Caractéristiques et de la Distribution des Lymphocytes T CD8⁺ Exprimant des Récepteurs de Molécules HLA Class I au cours de l'Hépatite Virale C Chronique.

Nos connaissances sur la biologie des lymphocytes T CD8⁺ au cours de l'hépatite C ont progressé ces dernières années. Par exemple, le développement de réactifs tels que les complexes multimériques HLA:peptide VHC a permis d'obtenir des informations importantes sur les caractéristiques et la fréquence de cellules T CD8⁺ reconnaissant spécifiquement des fragments de protéines du VHC. Cependant, à la différence d'autres infections virales chroniques, les cellules T CD8⁺ des patients atteints d'hépatite C chronique n'ont pas (ou peu) été étudiées du point de vue de l'expression de récepteurs de molécules HLA de classe I normalement observés à la surface des cellules NK (NKR) et qui sont capables de délivrer des signaux inhibiteurs. Ces signaux peuvent, comme expliqué précédemment, moduler la fonction des cellules T CD8⁺ mais aussi influencer leur résistance à la mort cellulaire. De tels récepteurs sont absents de la surface des cellules T CD8⁺ naïves mais peuvent être exprimés de façon stable sur les cellules T CD8⁺ ayant des caractéristiques de cellules activées et/ou mémoires. Il a été proposé que les situations d'infection chronique pourraient représenter un contexte propice à l'accumulation de cellules T CD8⁺ exprimant des NKRs.

Etant donné que les cellules T CD8⁺ sont nombreuses au sein du foie des patients atteints d'hépatite C chronique, nous avons recherché la présence de tels récepteurs sur les cellules CD8⁺ isolées à partir du foie mais aussi du sang. Nous nous sommes concentrés sur l'analyse de NKRs relativement bien caractérisés ; un NKR apparenté à la famille des lectines de type C (NKG2A associé à CD94) qui se lie aux molécules non classiques de classe I HLA-E et des membres du groupe KIR des NKRs de type immunoglobuline (CD158a,b et CD158b,j) qui se lient à des régions polymorphiques des molécules classiques de classe I HLA-C. Les cellules T CD8⁺ exprimant NKG2A ou des KIRs se sont révélées être des cellules non naïves avec des caractéristiques phénotypiques particulières, parfois plus ou moins prononcées chez les patients par rapport aux individus contrôles. Nous n'avons pas observé de phénomènes d'accumulation généralisée de ces populations cellulaires dans le foie ou le sang des patients. Par rapport aux paramètres cliniques de la maladie, une des observations principale concerne une corrélation positive entre la fréquence intra-hépatiques de cellules T CD8⁺ exprimant NKG2A et le degré de sévérité des lésions. Cette association est discutée à l'aide des connaissances dont on dispose vis à vis de NKG2A et des conséquences fonctionnelles possibles liées à son expression par des lymphocytes T CD8⁺. Quelques résultats complémentaires obtenus sur un petit nombre d'individus sont présentés à la suite de l'article.

Features and Distribution of CD8 T cells with HLA Class I Specific Receptor Expression in Chronic Hepatitis C.

Paula Bonorino¹, Vincent Leroy^{1,2}, Martine Pernollet^{1,3}, Eric Vivier⁴, Jean-Pierre Zarski^{1,2}, Patrice N. Marche^{1,2} and Evelyne Jouvin-Marche¹.

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 548; Commissariat à l'Energie Atomique – DRDC; Université Joseph Fourier, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

²Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble, La Tronche, France.

³ Laboratoire d'Immunologie, Etablissement Français du Sang (EFS) Rhône-Alpes Grenoble, La Tronche, France.

⁴Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML) CNRS-INSERM-Université de la Méditerranée Campus de Luminy, Case 906, 13288 Marseille Cedex 09, France.

Running title: NKR⁺ CD8 T cells in chronic Hepatitis C.

Keywords: Liver, T cell subsets, NK cell receptors, KIR, NKG2A

NKR⁺ CD8 T cells in chronic Hepatitis C

Abstract

CD8⁺ T cells represent a sizable component of the liver inflammatory infiltrate in chronic Hepatitis C and are thought to contribute to immune-mediated tissue injury. In line with this notion, we observed that an increased fraction of intra-hepatic CD3⁺CD8^{bright} lymphocytes is associated with enhanced lesion severity. Since chronic stimulation might promote the expression by CD8⁺ T cells of distinct types of human leukocyte antigen (HLA) Class I specific receptors typically expressed on Natural Killer cells (NKRs), we examined the distribution and characteristics of NKRs⁺CD8⁺ T cells in patients with persistent HCV infection. We found that the intra-hepatic frequency of CD8⁺ T cells with expression of NKG2A was positively correlated with increased lesion severity. Moreover, there was a clear inverse relationship between the viral load and the frequency of intrahepatic CD94⁺CD8⁺ T cells. In patients, circulating CD8⁺ T cells expressing killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) molecules exhibited phenotypic features of memory T cells but with exacerbated expression of the senescence marker CD57. NKG2A⁺CD8⁺ T cells were antigen-experienced cells that appeared less differentiated than KIRs⁺CD8⁺ T cells with a trend toward a lowered perforin content in patients. In conclusion, these observations provide novel insights into the complexity of liver infiltrating CD8⁺ T cells in chronic Hepatitis C and reveal that distinct subsets of antigen-experienced CD8⁺ T cells are differentially sensitive to the pervasive influence of HCV.

Introduction

Hepatitis C is a liver-targeting infectious disease caused by a non cytopathic RNA virus (HCV). If HCV is not rapidly cleared by the immune system, the infection becomes chronic, causes inflammation, mononuclear cell infiltration, hepatocytes destruction, progression to fibrosis, can lead to cirrhosis and in some instance, to hepatocellular carcinoma (1, 2). While vigorous HCV specific T cell responses can allow for virus clearance, HCV persists in a majority of cases (3-6). Among liver lymphocytes of chronic hepatitis C (cHC) patients are many CD8⁺ T cells with signs of activation (7). Such a population comprises very few T cells reactive to HCV because HCV specific CD8⁺ T cells are difficult to detect within the persistently infected liver (8-10). HCV specific CD8⁺ T cells differ from other virus specific CD8⁺ T cells in the sense that they seem incompletely differentiated. Thus, many of them retain expression of CD27 and CD28 costimulatory molecules that are missing on fully differentiated cytomegalovirus (CMV) specific CD8⁺ T cells (11, 12). Our knowledge of CD8⁺ T cells in cHC has thus progressed recently. Nevertheless, some features remain poorly explored. For instance, some human leukocyte antigen class I (HLA-I) reactive membrane receptors typically expressed on Natural Killer cells (NKRs) can be expressed by CD8⁺ T cells and influence their properties. Although the expression of some NKRs has been examined in several chronic viral infections, including Epstein-Barr virus (EBV), CMV and human immunodeficiency virus (HIV) infections (13-16) little is known with respect to HLA-I specific NKRs expression by CD8⁺ T cells during cHC.

Depending on the nature of the ligand binding domain, HLA-I reactive NKRs can be subdivided in two major groups. The first group corresponds to molecules whose ectodomain belongs to the C-type lectin domain family such as NKG2A/CD159A that associates with CD94 to form inhibitory heterodimers. The second group corresponds to molecules whose ectodomain consists of immunoglobulin (Ig)-like domains. The latter group includes killer cell Ig-like receptors (KIRs) and leukocyte Ig-like receptor 1/Ig-like transcript 2 (LIR1/ILT2/CD85j). While CD94:NKG2/CD159 heterodimers react to the non classical HLA-I molecule HLA-E, KIR family members bind to polymorphic residues of classical HLA-I. As to LIR1/ILT2/CD85j, it reacts to classical HLA-I with poor affinity (17-21).

KIRs are not detected on naïve CD8⁺ T lymphocytes but they can be surface expressed on CD8⁺ T cells harboring memory cell-associated phenotypic features. In most cases, they correspond to KIRs with high affinity for their HLA-I ligands and that can negatively regulate effector functions (inhibitory KIRs) (20). KIRs expression by CD8⁺ T cells reflects prior TCR engagement, is stable and remains unaltered in culture (22, 23). With

respect to the inhibitory heterodimer CD94:NKG2A, its surface expression on CD8⁺ T cells depends on TCR engagement and is observed on T cells with memory/effector phenotype (24). Various observations support the notion that HLA-I reactive NKRs expressed by CD8⁺ T cells can impair their effector functions (14, 15, 25-27). In addition, NKRs expression might modulate CD8⁺ T cell susceptibility to activation-induced cell death (AICD) and therefore impact on memory T cell generation (20).

In cHC patients, initiation and progression of liver damages, which are characterized by portal lymphoid infiltration and degenerative lobular lesions, are essentially driven by the host regional immune response (3). CD8⁺ T cells are abundant within the diseased liver, both in the lobular and periportal areas (7, 28) and can be cytotoxic for HCV-infected as well as non infected liver cells through various mechanisms (9, 29, 30). Given these characteristics and because HLA-I specific NKRs can be expressed by CD8⁺ T cells with an effector/memory phenotype, we examined the expression of members of both group 1 (CD94-NKG2A heterodimers) and group 2 (CD158a/h and CD158b/j KIRs) HLA-I specific NKRs by intrahepatic and circulating CD8^{bright} T lymphocytes from patients with characterized HCV chronic infection.

Patients and Methods

Patients.

All cHC patients analyzed (Service d'Hépatologie-Gastroentérologie, CHU-Grenoble) (**Table I** shows demographic and clinical characteristics) were anti-HCV antibody positive (ELISA 3, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA) and HCV-RNA positive by RT-Q-PCR (Amplicor HCV, Roche Diagnostic Systems, Meylan, France). HCV genotype was determined by Inno-Lipa technology (Innogenetics, Zwijnaarde, Belgium). Patients were negative for detectable presence of antibodies to HIV and HBV surface antigen and their alcohol consumption was lower than 30g/day. Ferritin, α 1 antitrypsin and ceruloplasmin levels were normal. Patients underwent needle liver biopsy as part of their diagnostic evaluation. None of the patients had biochemical markers of autoimmune hepatitis and none had received antiviral therapy at the time of the liver biopsy. Peripheral blood samples from patients were collected in heparinized vacutainer tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by using Ficoll-hypaque density gradient separation. The study was in agreement with the local ethics committee recommendations and all patients gave a written informed consent. Blood samples from healthy volunteers were obtained from the Etablissement Français du Sang (La-Tronche, France).

Isolation of intrahepatic cells.

Liver biopsies obtained using 1.5 mm diameter disposable biopsy needle were divided for histopathological examination (Metavir scoring system) and immunological analysis. For cell suspension analysis, fresh fragments collected in RPMI 1640 10 % AB human serum were washed extensively, shaken in media to minimize blood cells contamination and disrupted mechanically into small pieces in complete media. Cell suspensions were prepared in complete media by using a glass mortar. Cells were washed and processed immediately for analysis.

Bulk expansion of liver infiltrating lymphocytes.

Infiltrating T lymphocytes isolated from fresh liver tissue were expanded polyclonally in bulk culture (unprimed, bulk-expanded) in the presence of irradiated (30 Gy) autologous PBMCs (10^5 cells/well), recombinant interleukin(IL)-2 (100 IU/ml) and phytohemagglutinin A (PHA) (2 μ g/ml) in 96 well plates (10^5 cells/well) for 2 weeks in RPMI 1640 media containing 10% AB human serum, 1 mM glutamine, 1% non-essential amino acids, 1% sodium pyruvate, 50

µg/ml penicillin/streptomycin (Gibco Life Sciences, Rockville, MD) at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Half of the media was replaced twice a week and cells were splitted at confluence. Expanding cells were transferred to 24 well plates, then to flasks and maintained for 2-3 weeks without restimulation with addition of fresh media and IL-2 twice a week. Bulk expanded lymphocytes were used directly or cryopreserved.

Monoclonal antibodies.

The monoclonal antibodies used for immunophenotyping were anti-HLA-A2-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (clone BB7.2), anti-CD3-R-Phycoerythrin-Cyanine 5 (PE)Cy5 (UCHT1), anti-CD8α-FITC (SK1), anti-CD28-FITC (CD28.2), anti-CD27-FITC (M-T271), anti-CD45RA-FITC (HI100), anti-CD45RO-FITC (UCHL1), anti-CD57-FITC (NK-1), anti-CD85j/LIR1-PE /FITC (GHI/75) and anti-Perforin-FITC (δG9) from Becton-Dickinson Biosciences (Le Pont-de-Claix, France). Anti-CD8α-Allophycocyanin (APC) (B9.11), anti-CD158a,h purified or coupled to PE or APC (EB6), anti-CD158b1,b2,j purified or coupled to PE or APC (GL183), anti-NKG2A(CD159A) purified or coupled to PE (Z199), anti-CD94-PE (HP3B1) were obtained from Beckman Coulter France (Villepinte, France). Anti-NKG2A-APC (131411) and purified anti-CD158b2/KIR2DL3 (180701) was from R&D Systems (Lille, France). Anti-CD62L-FITC (FMC46) was from Serotec (Oxford, UK). F(ab')₂ of goat anti-mouse IgG-FITC was from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) or Sigma (St. Louis, MO).

Immunostaining and Flow Cytometry.

Freshly isolated PBMC or intrahepatic samples (0.2 to 1 × 10⁶ cells) were immunostained by incubating with a saturating amount of appropriate labeled antibodies in phosphate buffered saline (PBS) for 30 min in the dark at 4°C. Cells were washed twice and analyzed immediately. For indirect staining, cells first were incubated with unconjugated purified primary mAb, followed by a F(ab')₂ of goat anti-mouse Ig-FITC conjugate. For intracellular staining, cells were first surface stained, washed and subjected to fixation/permeabilisation (Cytofix/Cytoperm kit, BD PharMingen), prior to staining for intracellular molecules according to the manufacturer instructions. Multi-parameter flow cytometric analysis was performed on a FACSCalibur instrument with the CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Nonviable cells were excluded by electronic gating using FSC/SSC measurements. Depending on the conditions, 20.000 to 200.000 gated events were acquired.

Peptide:human leucocyte antigen (HLA) class I multimers.

Soluble R-PE-labeled HCV peptide:HLA-A*0201 multimers containing the non-structural (NS)3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ (CINGVCWTV), NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ (KLVALGINAV) and NS5₂₅₉₄₋₂₆₀₂ (ALYDVVTKL) peptides were obtained from Proimmune Limited (Oxford, UK). Staining was performed according to the manufacturer's instructions.

Statistical methods.

The SPSS 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for statistical analysis. P values shown for comparison between patients and controls were calculated by using the nonparametric Mann-Whitney U-test. Within-group comparisons were evaluated using the Wilcoxon signed rank's test. Bivariate correlations were done by computing a Spearman's correlation coefficient. All comparisons were 2-tailed. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Results

CD8^{bright} T lymphocytes enrichment in damaged liver from cHC patients.

We previously observed a significant positive correlation between liver lesions severity and the frequency of intrahepatic CD3⁺ lymphocytes in cHC patients (31). On the other hand, we found an accumulation of CD8 β transcripts in liver biopsies with high histological activity index relative to samples with milder index (32). Together, these observations were suggestive of an enrichment of CD8⁺ T lymphocytes within the diseased liver. We therefore directly examined the frequency of T cells with high CD8 expression (CD3⁺CD8^{bright} lymphocytes thereafter referred to as CD8⁺ T cells), in liver biopsies from cHC patients with various degrees of histological lesions. The results indicated that the fraction of both total CD3⁺ (**Fig. 1A**) and CD3⁺CD8⁺ (**Fig. 1B**) intrahepatic lymphocytes were significantly increased in patients with moderate and marked liver lesions (Metavir Activity score: A2-A3) relative to patients with minimal liver damage (Metavir Activity score: A1) ($p = 0.03$ and $p = 0.02$ for CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺ populations respectively). This observation suggests that, in cHC patients, the progression from mild to marked histological lesions is associated with an increase in the size of the CD8⁺ T cell pool within the liver infiltrate.

Ex vivo detection of CD8⁺ T cells expressing HLA-I specific NKRs in the liver of cHC patients.

As CD8⁺ T cells that express HLA-I specific NKRs are antigen-experienced cells whose presence might be associated with situations of chronic stimulation (13, 33), we investigated whether substantial fractions of intrahepatic CD8⁺ T cells from cHC patients express such receptors. To this end, we examined *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes for surface expression of NKG2A, CD94, and of the CD158a/h and CD158b/j KIR receptors. Unlike LIR1/ILT2/CD85j whose engagement has no major effect on the sensitivity of CD8⁺ T cells to AICD (20), and a versatile inhibitory effect on their effector functions (21), KIRs expressed on CD8⁺ T cells can deliver inhibitory signals susceptible to strongly alter effector functions and to protect against TCR-mediated AICD (20, 21). The data in **Figure 2B** indicate that intrahepatic lymphocytes from cHC patients do comprise CD8⁺ T cell subsets with surface expression of NKG2A, CD94 or CD158a/h-CD158b/j KIR molecules. The frequencies were as follows (median and extreme values are indicated): NKG2A⁺: 5 % (1-14), CD94⁺: 12 % (1-69), CD158a/h⁺: 4 % (0.7-9), CD158b/j⁺: 11 % (1.6-28) (**Fig. 3**). It is hence possible to visualize

ex vivo the presence of subpopulations of CD8⁺ T cells with expression of HLA-I specific NKR of both the KIR and C-type lectin families within the liver of cHC patients.

Increased liver injury correlates with a high frequency of intrahepatic NKG2A+CD8⁺ T lymphocytes.

Since KIRs and NKG2A surface expression by CD8⁺ T cells reflects prior TCR-mediated activation *in vivo* (20, 33), we searched for possible correlation between the frequency of NKR+CD8⁺ T cells and clinical parameters. We observed a significant positive correlation between the lesion severity estimated by the Metavir Activity score (A0 to A3) and the frequency of intrahepatic NKG2A+CD8⁺ T cells ($r = 0.645$, $p = 0.017$) (**Table II**). Correlations with the frequency of KIR+CD8⁺ liver T cells were not significant. In contrast, the frequency of intrahepatic CD94+CD8⁺ T cells was negatively correlated with lesion severity at a level very close to statistical significance ($r = -0.543$, $p = 0.055$). No correlations were found between frequencies of NKR+CD8⁺ T cell subsets and the extend of fibrosis within the inflamed liver (**Table II**) or the serum level of alanin aminotransferase (ALAT) (not shown). Thus, a salient feature of the histological analysis was that in patients with HCV persistent infection, an increase in the percentage of liver infiltrating NKG2A+CD8⁺ T cells associates with an enhanced liver lesions severity.

The serum viral load correlates negatively with the frequency of intrahepatic CD94+CD8⁺ T cells.

Besides histological parameters, we looked for potential association between percentages of NKR+CD8⁺ T cells and the HCV load detected in the serum of patients. We found a single significant correlation, namely; the frequency of intrahepatic CD8⁺ T cells with CD94 expression was correlated with the value of the viremia in the sera. Such a correlation was high and negative ($r = -0.8$, $p = 0.01$).

HLA-I specific NKR expression by intrahepatic HCV-specific CD8⁺ T cells in cHC patients.

To determine whether HLA-I specific NKR expression could be detected among HCV specific intrahepatic CD8⁺ T cells, we performed costaining with HCV-peptide/HLA-class I multimers reagents. Although the frequency of CD8⁺ T cells specific for a given peptide/HLA-A2 complex may be higher in the liver than among circulating CD8⁺ T cells (34, 35), it usually remains very low (from 0.01 %, or less, to 1 % of total CD8⁺ T cells). For

this reason, we used a cocktail of three HCV-peptide/HLA-A2 multimer reagents. The multimers used were made of HLA-A*0201 molecules complexed to the well characterized NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁, NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ and NS5₂₅₉₄₋₂₆₀₂ HCV epitopes. **Figure 4** shows that it was possible to detect minute fractions of HCV specific CD8⁺ T cells with surface expression of NKG2A or KIRs receptors among unprimed, bulk-expanded, intrahepatic lymphocytes. The frequency of HCV specific, KIRs+CD8⁺ T cells was higher than that of NKG2A+CD8⁺ T cells. Actually, both NKG2A⁺ and KIRs⁺ HCV specific CD8⁺ T cell frequencies were lower than that of HCV specific cells expressing LIR1/ILT2/CD85j molecules whose staining was included for comparison purpose, since it can be expressed by relatively large fractions of virus specific CD8⁺ T cells (20). Although a limited number of HCV determinants were studied here, the data indicate that liver CD8⁺ T lymphocytes from cHC patients can comprise fractions of virus specific cells with surface expression of HLA-I specific NKRs. In addition, KIRs expression by HCV specific CD8⁺ T cells suggests that some of these cells, albeit at an extremely low frequency, correspond to highly differentiated cells.

Analysis of circulating NKRs+ CD8⁺ T cell subsets in cHC patients

We next examined the features of blood NKRs+CD8⁺ T cells. The proportions of cells expressing HLA-I specific NKRs among circulating CD8⁺ T cells from cHC patients were comparable to those observed for control: CD158a/h⁺ : 2 % (0.2-18) versus 2 % (0.5-40); CD158b/j⁺ : 4 % (0.6-18) vs 4 % (0.65-26); NKG2A⁺ : 4 % (1-21) vs 3 % (0.8-70); CD94⁺ : 9 % (0.7-68) vs 5 % (0.14-100) (**Fig. 3**). In patients, the proportions of liver and blood CD8⁺ T lymphocytes expressing HLA-I specific NKRs were comparable with the exception of CD158b/j⁺CD8⁺ T cells whose intrahepatic frequency (11 % (1.6-18)) was twice the frequency found in the periphery (4 % (0.6-18)) ($p = 0.0068$). As to correlations between circulating NKRs+CD8⁺ T cell frequencies and clinical parameters, blood CD158a/h⁺CD8⁺ T cells showed low and inverse correlations with both the Metavir Activity score ($r = -0.382$, $p = 0.049$) and the fibrosis score ($r = -0.423$, $p = 0.025$) (**Table II**). In addition, circulating CD94⁺CD8⁺ T cell frequencies negatively correlated with the extent of fibrosis ($r = -0.390$, $p = 0.04$). No correlation was found between the frequency of blood NKR+CD8⁺ T cell subsets and the ALAT serum level (not shown).

Phenotypic features of circulating NKRs+CD8⁺ T cells in cHC patients.

To gain insights into the differentiation status of NKRs+CD8⁺ T cells, we examined their phenotype. Due to the very low absolute number of CD8^{bright} T cells that can be recovered

from liver biopsies, we used PBLs (**Table III**). In both controls and patients, most circulating KIRs(CD158a/h plus CD158b/j)+CD8+ T cells expressed CD45RA (controls: 85%, patients 76%) and only few expressed CD45RO (controls 23%, patients: 11%). Concerning expression of the replicative senescence marker CD57, we observed however that, while the frequency of positive cells was comparable between KIRs+CD8+ T cells from patients and controls (56 and 64 % respectively), there was a marked increase in the CD57 surface expression level on CD57+KIRs+CD8+ T cells from patients as assessed by analysing the mean fluorescence intensity (MFI)(**Fig. 5A, B**). KIR+CD8+ T cells from both cohorts comprised a minority of cells positive for CD27 and CD28 relative to their KIR- counterparts with however, a trend toward a further reduced CD28+ cell frequency in patients (**Fig. 5C**). With respect to NKG2A+CD8+ T cells, the high proportions of CD45RO+ (81%), CD27+ (86%) and CD28+ (74%) cells seen in controls were virtually unchanged in patients. As to CD57, the proportion of positive cells among NKG2A+CD8+ T cells was lower (controls: 28%, patients: 29 %) than among KIR+CD8+ T cells and there was no significant variation in CD57 expression level (not shown). Finally, there were more blasting (FSC^{high}) cells among circulating CD158a,h+CD8+ and NKG2A+CD8+ T cells from patients and controls than among their NKR- counterparts (**Table IV**). Overall, the analysis of CD8+ T cells expressing either KIRs or NKG2A molecules indicates that both subsets display phenotypic characteristics of effector/memory CD8+ T cells (20, 33). In patients and controls, NKG2A+CD8+ T cells appeared less differentiated than KIRs+CD8+ T cells. Finally, the markedly increased CD57 expression on KIRs+CD8+ T cells from patients reveals that the phenotype of distinct NKRs+CD8+ subpopulations can differ in cHC patients and controls.

Scarcity of perforin+ cells among blood NKG2A+CD8+ T cells from cHC patients.

Because perforin is central to granule exocytosis-dependent cytotoxicity, the lytic potential of CD8+ T cells expressing HLA-I specific NKRs was estimated by studying the perforin cellular content. Intracellular stainings showed that circulating KIRs+CD8+ and NKG2A+CD8+ T cells were both enriched in perforin+ cells when compared to NKR-CD8+ T cells (**Fig. 6A**). However, while this enrichment was fairly stable among KIRs+CD8+ T cells from patients, the proportion of perforin positive cells among NKG2A+CD8+ T lymphocytes in patients tended to be reduced relative to controls (**Fig. 6B**). This trend is reminiscent of the reduced frequency of perforin+CD8+ T cells previously noticed in HCV+ patients (36). Thus, during cHC, there might exist a differential modulation of perforin expression among subsets of CD8+ T cells expressing distinct HLA-I specific NKRs.

Discussion

In this study, we have examined blood and liver CD8^{bright} T cells from cHC patients for HLA-I specific NKR expression because such molecules can be expressed on antigen-experienced CD8⁺ T cells and might be associated with conditions of chronic stimulation/inflammation (13, 33). While there was no overt accumulation of KIRs+CD8⁺ or NKG2A+CD8⁺ T cells among blood cells from patients, the results indicate that within the cell infiltrate of the liver, the frequency of NKG2A+CD8⁺ T cells correlates with lesion severity. In contrast, we found an inverse relationship between the viral load and the frequency of intrahepatic CD94+CD8⁺ T cells. Finally, phenotypic characteristics of blood CD8⁺ T cells with expression of KIRs or NKG2A were differentially affected by the inflammatory context of cHC.

CD8⁺ T cells are abundant among intrahepatic cells in cHC infection and are suspected to be instrumental in lesions development (7, 28, 37, 38). Possibly, the increased frequency of NKG2A+CD8^{bright} T cells in liver samples with marked lesion severity could relate to the fact that the liver can retain antigen-experienced CD8⁺ T cells (39-41), a phenomenon that could be reinforced during inflammation. In contrast, we found no evidence for accumulation of KIRs+CD8⁺ T cells in liver samples with aggravated lesions. In theory, some intra-hepatic NKG2A+CD8⁺ T cells could contribute to tissue damage. Although CD94:NKG2A engagement can reduce the activation threshold of CD8⁺ T cells, it does not functionally inactivate them and such inhibitory effect is not necessarily as efficient as that triggered by inhibitory KIRs at interfering with the cytolytic activity of anti-viral CD8⁺ T cells (20, 21, 26, 42). If intra-hepatic NKG2A+CD8⁺ T cells participate to liver lesions, the contribution of HCV reactive CD8+NKG2A⁺ T cells is most likely marginal given the scarcity of HCV specific CTLs within the liver (8-10). Rather, a putative deleterious role for liver NKG2A+CD8⁺ T cells could rely on bystander phenomena. In line with this possibility, there was still about 20% of perforin⁺ cells among them and based on their FSC profile, blasting cells were detectable among intrahepatic NKG2A+CD8⁺ T cells.

On the other hand, it is possible that the cytotoxic potential of intrahepatic NKG2A+CD8⁺ T cells is indeed inhibited. In distinct systems (27, 43), CD94-NKG2A engagement could control cytotoxic T lymphocytes effector functions. Such an inhibitory capacity significantly depends on the amount of accessible ligand. Limited access to HLA-E molecules might not allow for an effective inhibition (20, 21). In the case of cHC however, HLA-E is abundantly expressed within the liver; its expression is enhanced in HCV⁺ patients relative to control livers (44). In addition, intrahepatic cells that stained positive for the HCV core antigen were HLA-E^{high} *in situ* and HCV core₃₅₋₄₄ peptide is able to bind HLA-E to form stable surface

complexes (44). Such a sustained HLA-E expression makes NKG2A+CD8+ liver T cells very likely to repeatedly encounter HLA-E *in situ* and therefore, to have their cytotoxic potential constrained. Finally, since repeated TCR engagements seem necessary to sustain high NKG2A expression (45, 46), and because the interaction with HLA-E itself does not modulate CD94:NKG2A expression (47), our observation that NKG2A MFI was slightly lower on liver NKG2A+CD8+ T cells than on their circulating counterparts in cHC patients (data not shown) suggests that intrahepatic NKG2A+CD8+ T cells might not be overtly reactive *in situ*. The fact that we did not detect a correlation between NKG2A+CD8+ liver T cell frequency and ALAT serum level is consistent with such a possibility.

In addition, the elevated HLA-E expression mentioned above is likely to provide NKG2A+CD8+ liver T cells with anti-apoptotic signals since CD94-NKG2A expression by T cells can confer enhanced resistance to AICD. Thus, the increased frequency of NKG2A+CD8+ T cells associated with marked lesions could reflect a selective survival advantage. Other CD94+CD8+ T cells lacking NKG2A expression might not display such a property. Indeed, CD94 expression is high on NKG2A+CD8+ T cells (48) and high CD94 expression on CD8+ T cells associates with an enhanced resistance to cell death (49). Unlike the frequency of NKG2A+CD8+ liver cells, the proportion of total CD94+CD8+ T cells seemed to decline in liver samples with marked lesions. This could be compatible with a preferential survival of NKG2A+CD8+ T cells. Albeit technically difficult, further experiments are hence needed to fully understand the properties of liver NKG2A+CD8+ T cells during cHC. It is possible that the positive correlation we observed between intrahepatic NKG2A+CD8+ T cell frequency and liver lesion severity indeed reflects a combination of several factors including the retention of activated/memory CD8+ T cells, an HLA-E-dependent, enhanced resistance to cell death and possibly, some level of activation/expansion. As to the negative association between the frequency of liver CD94+CD8+ T cells and the viral load, its meaning remains unclear at present.

Phenotypically, KIRs+CD8+ T cells from patients were antigen-experienced cells with a memory-like phenotype resembling that of terminal effector cytotoxic CD8+ T cells (20). NKG2A+CD8+ T cells were also antigen-experienced cells since there were enriched in CD45RO+ cells but they were less differentiated than KIRs+CD8+ T cells because many were CD27+CD28+ cells. CD94:NKG2A surface expression by CD8+ T cells is an early feature of antigen specific activation during infection and TCR engagement is a prerequisite for its induction (24). Therefore, NKG2A+CD8+ T cells must have responded to TCR-mediated stimulations *in vivo*. Given that the frequency of NKG2A+CD8+perforin+ (but not

KIRs+CD8+perforin+) T cells seemed reduced in patients relative to controls, the data suggest that NKG2A+CD8+ T cells from cHC patients are characterized by a milder differentiation status. While the fractions of NKG2A+CD8+ and KIRs+CD8+ T cells that expressed CD57 were quite comparable between patients and controls, the CD57 expression was enhanced on KIRs+CD8+ T cells from patients. Since CD57 expression by CD8+ T cells reflects a history of intense mitosis and a status of proliferative inability (50), we conclude that the majority KIRs+CD8+ T cells from cHC patients are truly terminally differentiated cells that have undergone more extensive *in vivo* division than their counterparts from controls.

Through yet unknown mechanism(s), HCV infection can influence phenotypic features of antigen-specific blood CD8+ T cells; CMV specific CD8+ T cells from HCV+ patients are thus less differentiated than their counterparts from controls. This phenomenon is referred to as pervasive influence (36). Here, we document phenotypic distinctions between NKR+CD8+ T cells from cHC patients and controls. Given that HCV specific CD8+ T cells only represent a minor fraction of CD8+ T cells (8, 10), our results suggest that HCV pervasive influence can affect whole subsets of terminally differentiated CD8+ T cells such as KIR+CD8+ T cells. In addition, KIRs+CD8+ T cells and NKG2A+CD8+ T cells presented exclusive distinctions in patients. Most KIRs+CD8+, but not NKG2A+CD8+, T cells, showed signs of enhanced replicative senescence. Conversely, many NKG2A+CD8+, but not KIRs+CD8+ T cells, revealed a lowered frequency of perforin+ cells. A reduced frequency of perforin+CD8+ T cells was indeed observed among CD8 T cells from HCV+ patients (36). Thus, our data indicate that distinct subsets of CD8+ T cells that express HLA-I specific NKRs differ in their susceptibility to HCV pervasive influence. Finally, the increased frequency of CD62L+ cells seen among CMV specific CD8+ T cells from HCV+ patients (36) was observed for neither KIRs+CD8+, nor NKG2A+CD8+, T cells from cHC patients in our study further illustrating the differential sensitivity of subsets of antigen-experienced CD8+ T cells to HCV pervasive influence.

We found very low fractions of HLA class I specific NKRs+ cells among HCV specific, liver CD8+ T cells. Of particular interest was the fact that some KIRs+CD8+ HCV specific CD8+ T cells were detectable. Since KIRs expression is a feature of antigen-experienced, terminally differentiated, CD8+ T lymphocytes (13), the surface expression of KIRs by HCV-peptide:HLA-A2 multimer positive CD8+ T cells indicates that some very rare virus specific CD8+ T cells do undergo extensive differentiation during cHC.

In summary, the *ex vivo* analysis of CD3+CD8^{bright} lymphocytes that express either KIRs or NKG2A molecules indicates that both subsets display exclusive phenotypic characteristics indicative of TCR-mediated activation *in vivo*. While the overall data do not support the idea that CD8+ T cells expressing HLA-I specific NKRs are actively accumulating during HCV persistent infection, they reveal that an intrahepatic subsets of such cells can correlate with aggravated liver lesions and that distinct subsets of NKRs+CD8+ T cells are differentially sensitive to the known pervasive influence of HCV.

Acknowledgements

We are grateful to patients who enrolled in this study. We thank the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes Grenoble (La Tronche, France) for providing us with blood samples from healthy donors. We also thank T. Dufeu-Duchesne for advices and C. Viret and M. Faure for helpful discussions.

Footnotes:

Contact information

Corresponding author: Dr. E. Jouvin-Marche, CEA DRDC and INSERM U548, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble cedex 9 (France) ; Tel: (33) 4 38 78 38 73; Fax: (33) 4 38 78 98 03; E mail: immuno@dsvsud.cea.fr

List of abbreviations

HLA: human leukocyte antigen

NKRs: Natural Killer receptors

KIR: killer cell immunoglobulin-like receptors

HCV : Hepatitis C virus

cHC: chronic Hepatitis C

CMV: cytomegalovirus

EBV: Epstein-Barr virus

HIV: human immunodeficiency virus

Financial support

This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and a specific grant from the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS). P.B. was supported by fellowships from the French government and from the ANRS.

References

1. Bhandari BN, Wright TL. Hepatitis C: an overview. *Annu Rev Med* 1995;46:309-317.
2. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004;12:96-102.
3. Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:391-424.
4. Racanelli V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003;24:456-464.
5. Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 2005;436:930-932.
6. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005;436:946-952.
7. Fiore G, Angarano I, Caccetta L, Serrone M, Jirillo E, Schiraldi O, Antonaci S. In-situ immunophenotyping study of hepatic-infiltrating cytotoxic cells in chronic active hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:491-496.
8. Abrignani S. Bystander activation by cytokines of intrahepatic T cells in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1997;17:319-322.
9. Bertoletti A, Maini MK. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Immunol* 2000;12:403-408.
10. Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol* 2005;6:873-879.
11. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8:379-385.
12. van Baarle D, Kostense S, van Oers MH, Hamann D, Miedema F. Failing immune control as a result of impaired CD8+ T-cell maturation: CD27 might provide a clue. *Trends Immunol* 2002;23:586-591.
13. Anfossi N, Doisne JM, Peyrat MA, Ugolini S, Bonnaud O, Bossy D, Pitard V, et al. Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8+ T cells. *J Immunol* 2004;173:7223-7229.
14. Andre P, Brunet C, Guia S, Gallais H, Sampol J, Vivier E, Dignat-George F. Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *Eur J Immunol* 1999;29:1076-1085.
15. De Maria A, Ferraris A, Guastella M, Pilia S, Cantoni C, Polero L, Mingari MC, et al. Expression of HLA class I-specific inhibitory natural killer cell receptors in HIV-specific cytolytic T lymphocytes: impairment of specific cytolytic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10285-10288.
16. Vely F, Peyrat M, Couedel C, Morcet J, Halary F, Davodeau F, Romagne F, et al. Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements. *J Immunol* 2001;166:2487-2494.
17. Moretta L, Mingari MC, Bottino C, Pende D, Biassoni R, Moretta A. Cellular and molecular basis of natural killer and natural killer-like activity. *Immunol Lett* 2003;88:89-93.
18. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-274.
19. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005;5:201-214.
20. Vivier E, Anfossi N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol* 2004;4:190-198.

21. Mingari MC, Pietra G, Moretta L. Human cytolytic T lymphocytes expressing HLA class-I-specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 2005;17:312-319.
22. Young NT, Uhrberg M, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. *J Immunol* 2001;166:3933-3941.
23. Uhrberg M, Valiante NM, Young NT, Lanier LL, Phillips JH, Parham P. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol* 2001;166:3923-3932.
24. McMahon CW, Raulet DH. Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol* 2001;13:465-470.
25. Mingari MC, Ponte M, Cantoni C, Vitale C, Schiavetti F, Bertone S, Bellomo R, et al. HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells. *Int Immunol* 1997;9:485-491.
26. McMahon CW, Zajac AJ, Jamieson AM, Corral L, Hammer GE, Ahmed R, Raulet DH. Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells. *J Immunol* 2002;169:1444-1452.
27. Moser JM, Gibbs J, Jensen PE, Lukacher AE. CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses. *Nat Immunol* 2002;3:189-195.
28. Bertoletti A, D'Elia MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, et al. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997;112:193-199.
29. Ando K, Hiroishi K, Kaneko T, Moriyama T, Muto Y, Kayagaki N, Yagita H, et al. Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J Immunol* 1997;158:5283-5291.
30. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med* 1997;3:409-413.
31. Pernollet M, Jouvin-Marche E, Leroy V, Vigan I, Zarski JP, Marche PN. Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions. *Clin Exp Immunol* 2002;130:518-525.
32. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, Marche PN, et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:829-841.
33. Anfossi N, Pascal V, Vivier E, Ugolini S. Biology of T memory type 1 cells. *Immunol Rev* 2001;181:269-278.
34. He XS, Rehmann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, Wedemeyer H, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5692-5697.
35. Grabowska AM, Lechner F, Klenerman P, Tighe PJ, Ryder S, Ball JK, Thomson BJ, et al. Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 2001;31:2388-2394.
36. Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, et al. Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *J Immunol* 2004;172:1744-1753.
37. Liaw YF, Lee CS, Tsai SL, Liaw BW, Chen TC, Sheen IS, Chu CM. T-cell--mediated autologous hepatocytotoxicity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1995;22:1368-1373.

38. Kurokohchi K, Masaki T, Arima K, Miyauchi Y, Funaki T, Yoneyama H, Yoshida S, et al. CD28-negative CD8-positive cytotoxic T lymphocytes mediate hepatocellular damage in hepatitis C virus infection. *J Clin Immunol* 2003;23:518-527.
39. John B, Crispe IN. TLR-4 regulates CD8+ T cell trapping in the liver. *J Immunol* 2005;175:1643-1650.
40. Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* 1999;163:3202-3210.
41. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:51-62.
42. Miller JD, Peters M, Oran AE, Beresford GW, Harrington L, Boss JM, Altman JD. CD94/NKG2 expression does not inhibit cytotoxic function of lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 2002;169:693-701.
43. Speiser DE, Pittet MJ, Valmori D, Dunbar R, Rimoldi D, Lienard D, MacDonald HR, et al. In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1999;190:775-782.
44. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Ahlenstiel G, Zimmermann H, Leifeld L, Weiss EH, et al. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 2005;166:443-453.
45. Jabri B, Selby JM, Negulescu H, Lee L, Roberts AI, Beavis A, Lopez-Botet M, et al. TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 2002;17:487-499.
46. Moser JM, Byers AM, Lukacher AE. NK cell receptors in antiviral immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;14:509-516.
47. Borrego F, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE. NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes. *J Immunol* 2002;169:6102-6111.
48. Arlettaz L, Villard J, de Rham C, Degermann S, Chapuis B, Huard B, Roosnek E. Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alphabeta lymphocytes. *Eur J Immunol* 2004;34:3456-3464.
49. Gunturi A, Berg RE, Forman J. Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. *J Immunol* 2003;170:1737-1745.
50. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 2003;101:2711-2720.

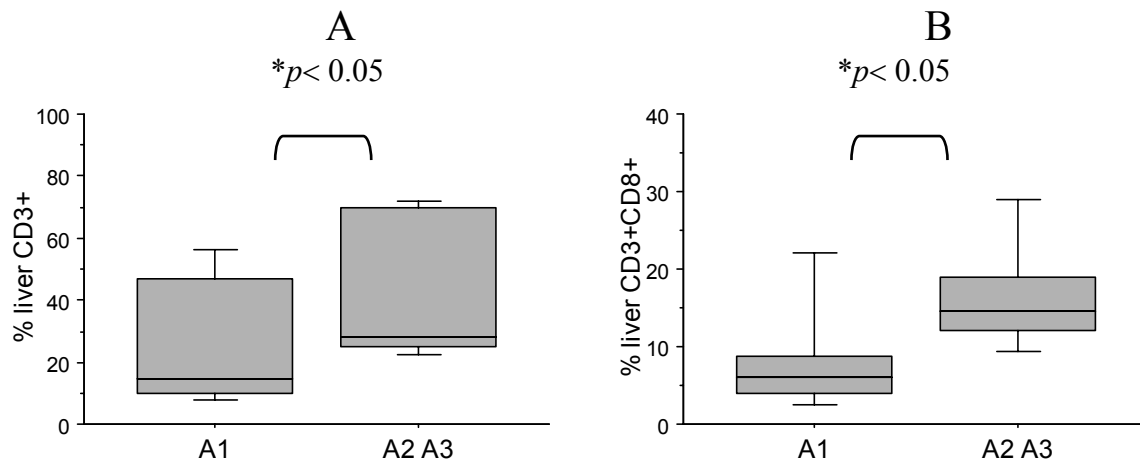


Figure 1. Increased frequency of CD8+ T lymphocytes in more severely injured liver tissue during chronic Hepatitis C.

The frequency of total T cells (A) and CD8+ T cells (B) among intrahepatic lymphocytes from chronic Hepatitis C (cHC) patients (y axis) with mild (Metavir Activity score: A1) or more severe (A2-A3 combined) hepatic damages (x axis) was assessed by using immunostaining and flow cytometry. The fractions of CD3+ and CD3+CD8^{bright} cells were examined after lymphocytes were gated by forward and side scatter characteristics. Patients whose liver tissue was severely damaged showed a higher frequency of infiltrating CD3+ and CD3+CD8^{bright} lymphocytes. The difference between the two groups of patients was statistically significant for both CD3+ ($p = 0.03$) and CD3+CD8^{bright} ($p = 0.02$) lymphocyte populations. Panel A: A1, $n = 14$; A2-A3, $n = 7$. Panel B: A1, $n = 11$; A2-A3, $n = 6$. Data are represented as boxplots showing medians (horizontal lines), upper and lower quartiles (boxes) and extreme values (whiskers). These associations were not seen when blood T cells were analyzed (not shown).

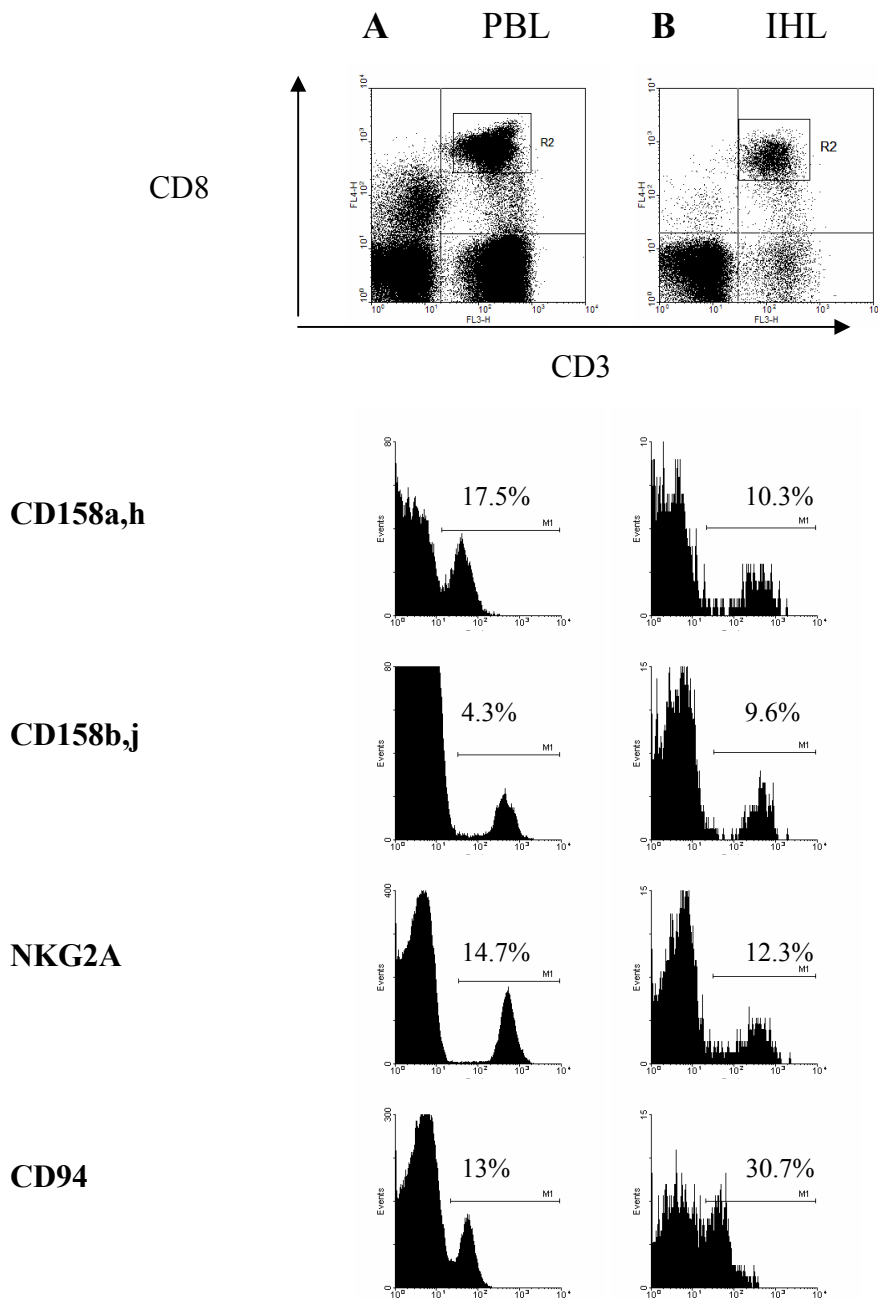


Figure 2. Presence of CD8+ T lymphocytes with surface expression of HLA class I specific NKR in peripheral blood and liver tissue from cHC patients.

The surface expression of CD158a/h, CD158b/j, NKG2A (CD159A) and CD94 was examined on peripheral blood lymphocytes (PBL) (A) and on liver infiltrating lymphocytes (IHL) (B) in patients with chronic hepatitis C by using four-color immunostaining as outlined in Methods. Flow cytometry data were plotted after electronic gating on CD3CD8 double positive lymphocytes (top panels). x axis: Log fluorescence intensity, y axis: cell count.

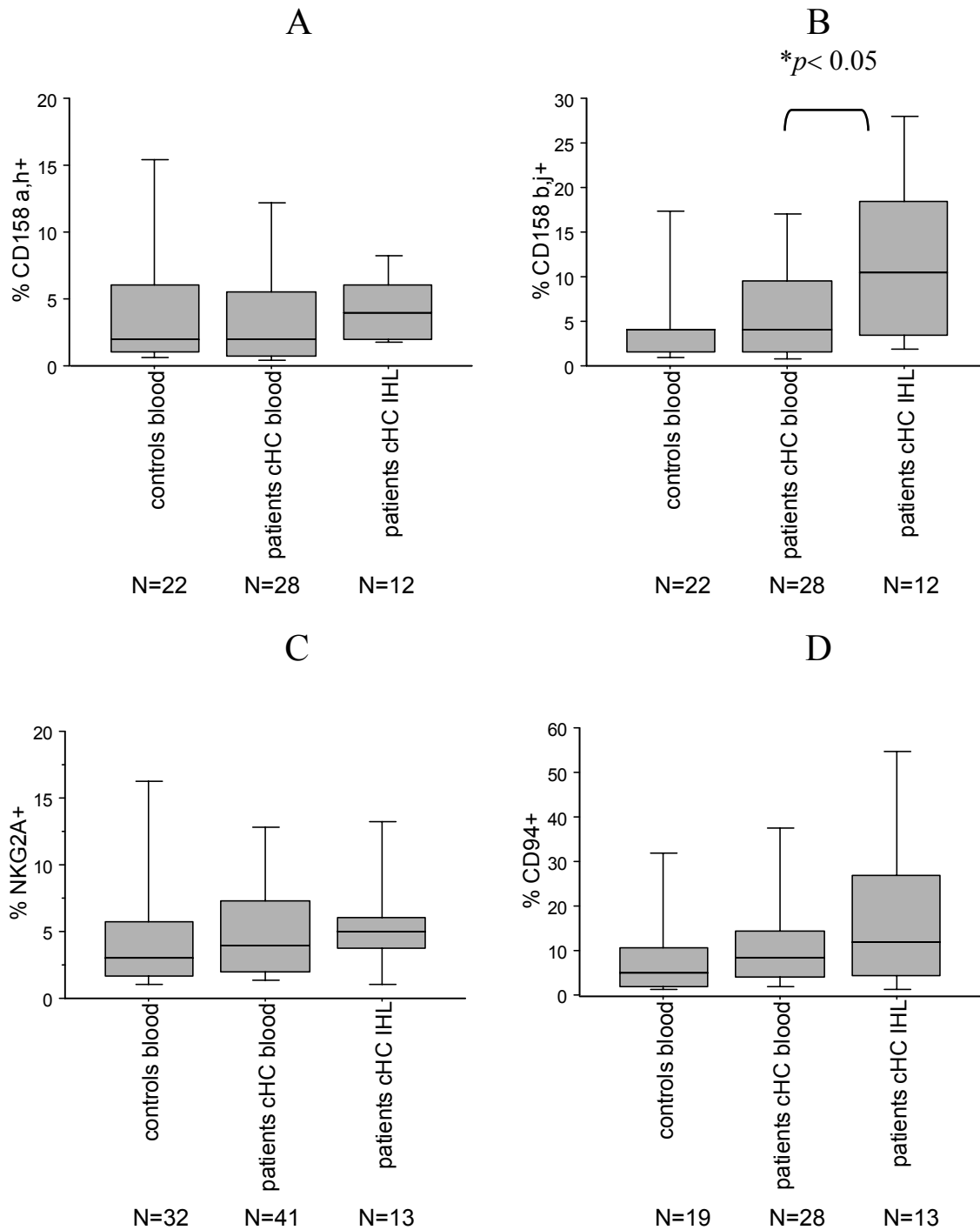


Figure 3. Frequency of CD8+ T lymphocytes expressing HLA class I specific NKR in cHC patients.

The frequency (y axis) of liver infiltrating and circulating NKR+CD8+ T lymphocytes in patients with chronic Hepatitis C (noted HCV+) was examined by multi-color immunostaining and flow cytometry as illustrated in Figure 2. **A:** CD158a,h **B:** CD158b,j **C:** NKG2A(CD159A) **D:** CD94. Peripheral blood cells from healthy individuals (noted HCV-) were analyzed in parallel. Values are represented as medians, the 25th and 75th percentiles (boxes), and ranges (whiskers). The statistical analysis (Mann-Whitney U-test) showed a significant difference between the frequencies of CD158b,j+ PBL and IHL in cHC patients ($p = 0.006$)

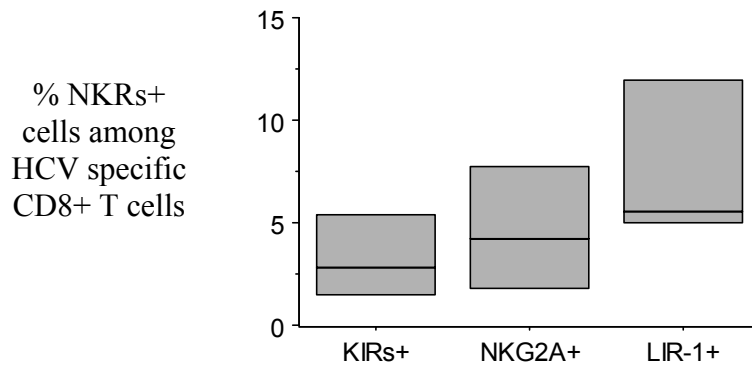


Figure 4. Scarcity of HCV specific CD8+ T lymphocytes expressing HLA class I specific NKRs among liver infiltrating cells from chronic Hepatitis C patients.

HCV specific CD8+ T cells present among unprimed, bulk-expanded, liver-infiltrating lymphocytes were examined for expression of KIRs or NKG2A receptors. KIRs (CD158a,h,b,j) expression and NKG2A(CD159A) expression were plotted after a combination of several electronic gateings defining lymphocytes (R1), CD3+CD8+ T cells (R2) and HCV peptide:HLA-A*0201 Multimer positive cells (R3). The HCV peptides bound to HLA-A*0201 were NS3 1073-1081 (CINGVCWTV), NS3 1406-1415 (KLVALGINAV) and NS5 2594-2602 (ALYDVVTKL). LIR-1(CD85j) staining was included for the purpose of comparison. The depicted data are representative of four independent experiments where HCV specific cells were detectable among expanded iHLs.

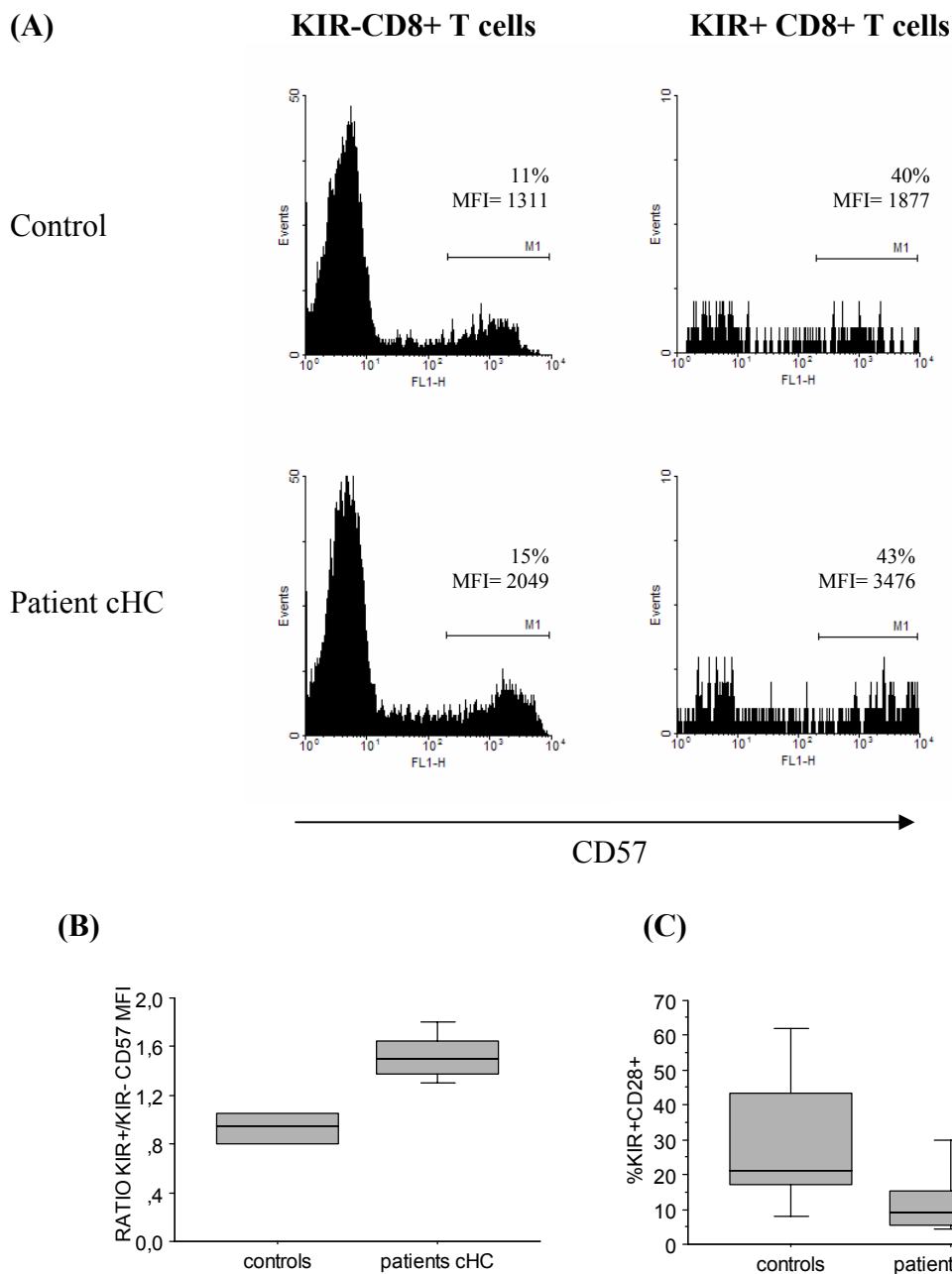


Figure 5. Surface expression level of the replicative senescence marker CD57 on KIRs+CD8+ T cells and frequency of CD28+KIRs+CD8+ T cells in chronically HCV-infected patients.

(A) Representative profiles for surface expression of CD57 by KIRs- and KIRs+CD8+ blood T cells from a healthy donor and a cHC patient. The fraction of CD57+ cells is indicated for both KIRs- and KIRs+ cells after gating on CD3+CD8+ circulating lymphocytes. The surface expression level of CD57 was examined by using CD57 mean fluorescence intensity (MFI) of positive cells. The KIR antibodies used comprised a mix of anti-CD158a,h and anti-CD158b,j mAbs. X axis: CD57 Log fluorescence intensity, y axis: cell count.

(B) The expression level of CD57 differs significantly ($p = 0.014$) between circulating cells from controls ($n = 4$) and cHC patients ($n = 5$). The data correspond to the ratio of CD57 MFI KIRs+CD8+ T cell to CD57 MFI KIRs-CD8+ T cell for both controls and patients.

(C) The frequency of circulating KIR+ CD8+ T cells expressing CD28 tended to be decreased in cHC patients ($n = 7$) relative to controls ($n = 5$) ($p = 0.061$).

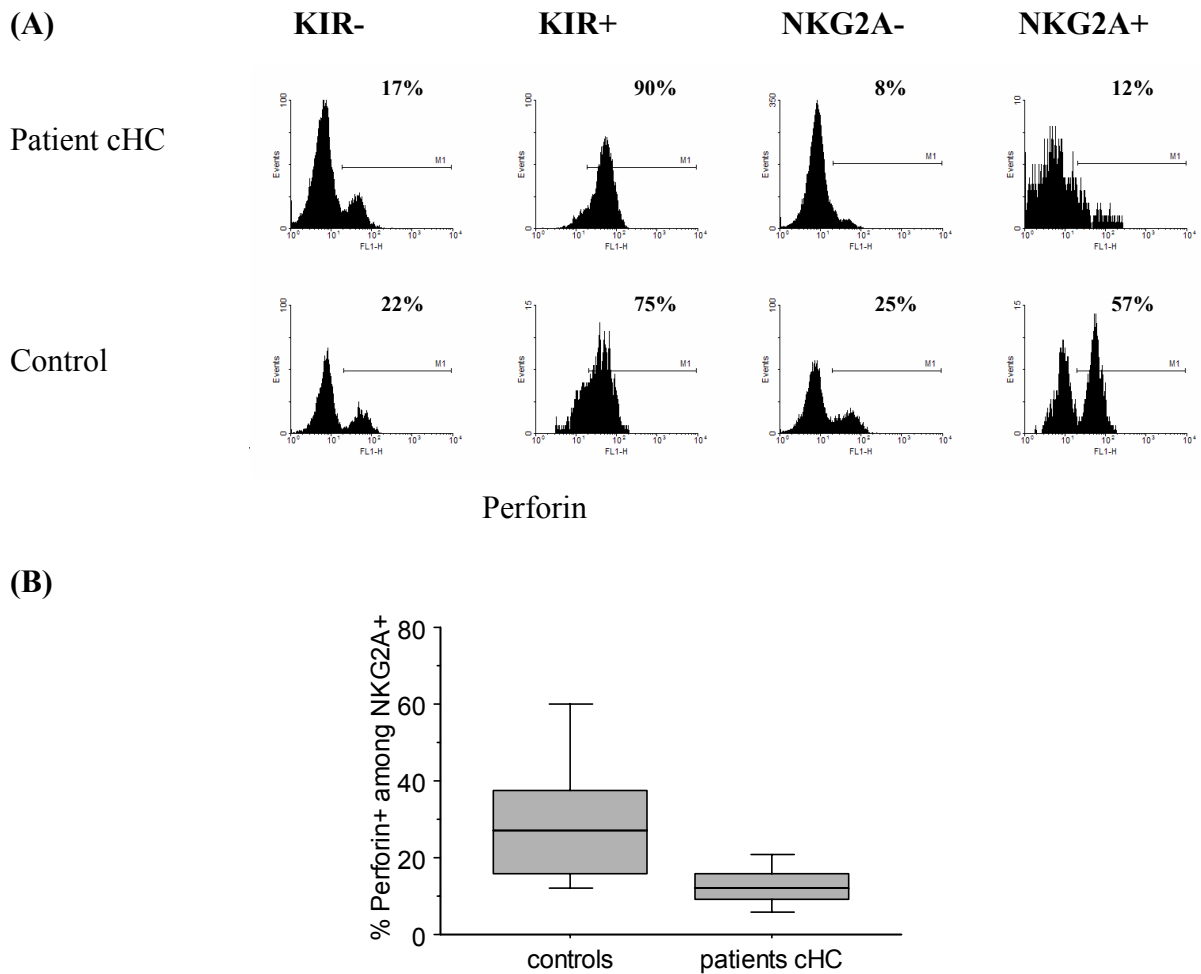


Figure 6. The perforin content of blood CD8⁺ T lymphocytes with surface expression of HLA class I specific NKR in patients with persistent HCV infection.

(A) Profiles for perforin content of NKR⁻CD8⁺ versus NKR⁺CD8⁺ circulating T cell populations are shown for a representative control and a cHC patient. The fraction of perforin positive cells is indicated for both NKR⁻ and NKR⁺ cells after gating on CD3⁺CD8⁺ lymphocytes. The perforin content was examined by intracellular immunostaining as outlined in Methods. A mixture of anti-CD158a,h and anti-CD158b,j mAbs was used to assess KIRs surface expression. Perforin mean fluorescence intensity (MFI) is indicated. x axis: perforin Log fluorescence intensity, y axis: cell count.

(B) The proportion of perforin positive cells among NKG2A⁺CD8⁺ T cells tended to differ between circulating cells from controls (n = 5) and patients with cHC (n = 5) ($p = 0.06$).

Table I: Demographic and clinical characteristics of chronically HCV-infected patients included in the present study (n = 50).

Female Sex*	15 (30%)
Age (years)**	49 (28-75)
<i>Source of infection*</i>	
Intravenous drug abuse	24 (48%)
Transfusion	12 (24%)
Other modes	5 (10%)
Unknown	9 (18%)
<i>Duration of infection (years)**</i>	21 (2-51)
<i>Plasma Viral load (log IU/ml) **</i>	6.10 (4.47-6.95)
<i>Viral genotype*</i>	
1	31 (62%)
2	6 (12%)
3	7 (14%)
4	4 (8%)
ND	2 (4%)
<i>ALT (IU/ml)**</i>	59 (22-253)
<u>Liver Histology*</u>	
<i>Metavir activity score</i>	
1	23 (46%)
2	17 (34%)
3	7 (14%)
ND	3 (6%)
<i>Metavir fibrosis score</i>	
0	4 (8%)
1	21 (42%)
2	14 (28%)
3	4 (8%)
4	6 (12%)
ND	1 (2%)

* Number of cases/total (percentage %)

** Median (range)

ND : not determined

IU/ml : international units par milliliter

ALT : alanine aminotransferase

Note that for technical reasons (number of cells available per sample), the entire set of experiments described could not be performed for every single patients.

Table II: Correlations between the frequency of CD8+ T cells expressing HLA-class I specific NK receptors and Activity and Fibrosis histological parameters defined by Metavir scores in chronically HCV-infected patients.

	% CD158a/h+	% CD158b/j+	% NKG2A+	% CD94+
IHLs				
Activity	r = - 0.119 p = 0.95	- 0.463 0.13	0.645 0.017*	- 0.543 0.055
Fibrosis	r = - 0.01 p = 0.97	- 0.32 0.30	0.328 0.274	- 0.069 0.822
Blood				
Activity	r = - 0.382 p = 0.049*	- 0.358 0.067	0.372 0.056	- 0.355 0.069
Fibrosis	r = - 0.423 p = 0.025*	- 0.328 0.088	0.078 0.694	- 0.390 0.040*

IHLs: intrahepatic lymphocytes.

r : correlation coefficient.

* : p values less than 0.05.

Liver infiltrating cells: n = 13, peripheral blood cells: n = 27.

TABLE III: Phenotypic features of peripheral blood CD8⁺ T cells subsets expressing HLA-class I specific NK receptors during chronic Hepatitis C.

	within CD3+CD8+KIR+		within CD3+CD8+NKG2A+	
	Controls	Patients cHC	Controls	Patients cHC
%CD45RA+	85 (65-97)	76 (59-97)	52 (32-75)	67 (26-99)
%CD45RA ^{high}	68 (58-92)	58 (45-92)	30 (18-37)	25 (18-91)
%CD45RO+	23 (2-28)	11 (7-50)	81 (71-83)	76 (27-90)
%CD27+	52 (19-69)	28 (5-66)	86 (75-91)	84 (8-97)
%CD28+	21 (8-62)	9 (4-33)	74 (52-88)	75 (23-91)
%CD62L+	56 (7-75)	19 (7-45)	36 (23-65)	16 (7-45)
%CD62L ^{high}	24 (3-56)	12 (2-25)	22 (5-37)	4 (2-10)
%CD57+	64 (38-62)	56 (35-95)	28 (11-52)	29 (15-86)

	within CD3+CD8+KIR-		within CD3+CD8+NKG2A-	
	Controls	Patients cHC	Controls	Patients cHC
%CD45RA+	72 (47-85)	55 (42-68)	76 (47-84)	68 (55-92)
%CD45RA ^{high}	64 (36-71)	46 (23-57)	68 (37-72)	59 (37-83)
%CD45RO+	21 (16-34)	44 (37-53)	28 (16-31)	37 (15-48)
%CD27+	90 (72-96)	81 (37-92)	92 (69-97)	79 (42-94)
%CD28+	79 (52-96)	71 (57-79)	86 (58-93)	79 (37-91)
%CD62L+	40 (26-73)	32 (27-41)	61 (41-77)	31 (10-40)
%CD62L ^{high}	11 (6-58)	11 (7-24)	51 (8-62)	9 (2-27)
%CD57+	18 (4-20)	16 (5-56)	22 (6-25)	25 (8-49)

The values represent the percentage (median (range)) of positive cells among CD8^{bright} T cells expressing or lacking KIRs or NKG2A receptors.

TABLE IV: Frequency of blasting cells within circulating subsets of CD8+ T lymphocytes expressing HLA-class I specific NK receptors.

% FSC^{high} cells within:	Controls	cHC patients
CD158a,h+	19 (6-65)	13 (4-38)
CD158b,j+	7 (5-31)	6 (3-25)
NKG2A+	17 (7-30)	12 (3-37)
CD158a,h-	7 (7-15)	7 (1-17)
CD158b,j-	6 (4-12)	8 (2-18)
NKG2A-	9 (4-14)	8 (0.7-19)

The values represent the percentage (median (range)) of FSC^{high} cells among CD8^{bright} T cells expressing or lacking KIRs or NKG2A receptors.

Représentation après sélection des cellules CD3⁺CD8⁺.

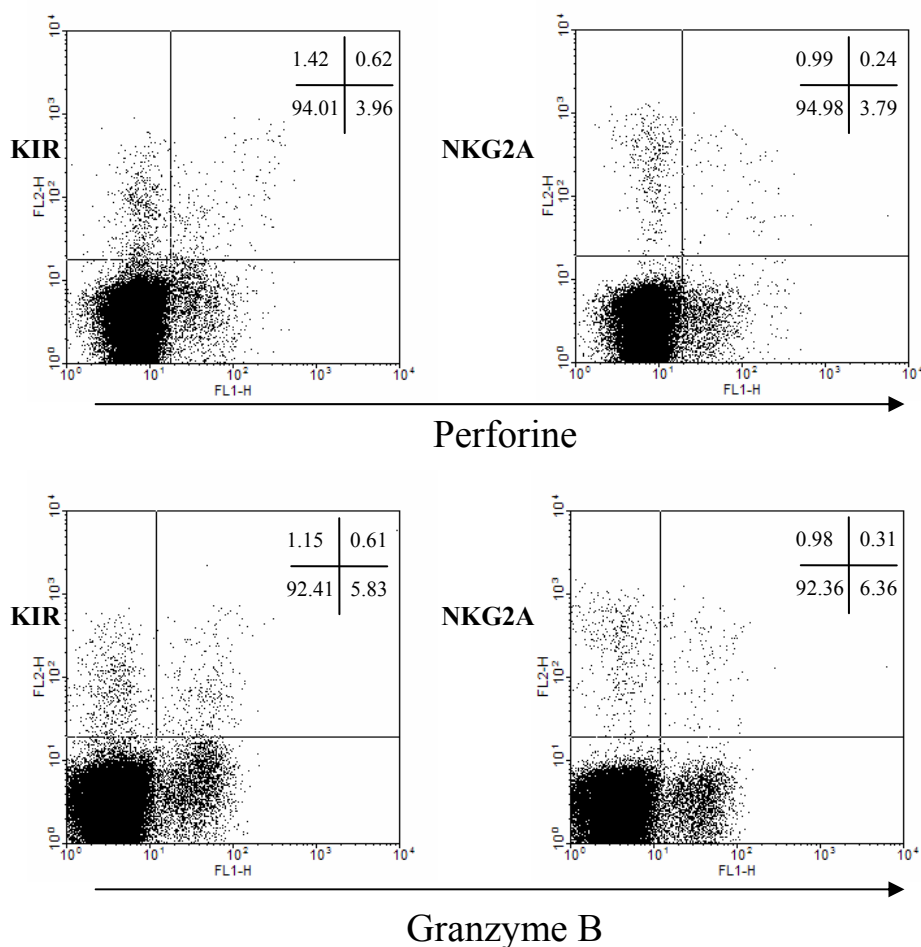
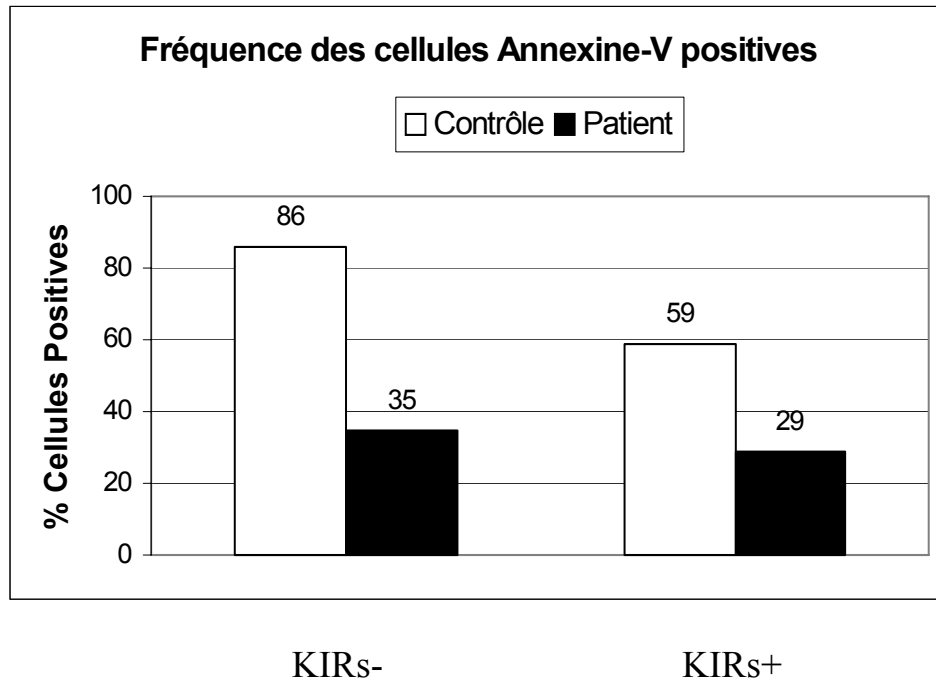


Figure complémentaire C1 : Profil comparable d'expression de Perforine et de Granzyme B par des lymphocytes T CD8⁺ exprimant des NKR.

Les fréquences des cellules positives pour deux molécules impliquées dans la cytotoxicité (Perforine et Granzyme B) ont été évaluées parmi la population des lymphocytes T CD8⁺ circulants exprimant les récepteurs spécifiques de molécules HLA classe I (KIRs ou NKG2A). Les proportions des cellules dans chaque quadrant sont indiquées. L'exemple correspond à un patient hépatite C chronique. Les fréquences de cellules positives pour Perforine ou Granzyme B ont été déterminées par marquage intracellulaire comme indiqué dans matériels et méthodes.

En raison du fait que, sur de petits échantillons de patients et de contrôles, les fréquences de cellules Perforine⁺ ou Granzyme B⁺ (parmi les lymphocytes T CD8⁺NKR⁺) étaient toujours comparables pour un même individu, nous avons utilisé un seul marquage (la Perforine) pour examiner le potentiel cytotoxique de ces sous populations parmi l'ensemble des patients et des contrôles.

(A)



(B)

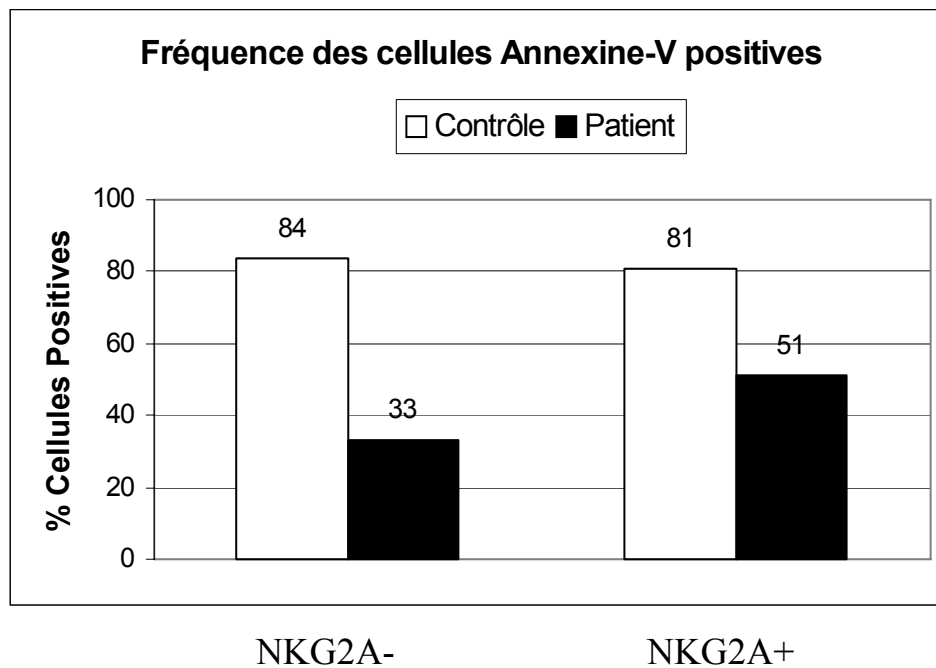


Figure C2 : Sensibilité réduite des cellules T CD8⁺ des patients à la mort cellulaire induite par l'activation.

La fréquence des cellules en voie d'apoptose après activation a été estimée par liaison de l'annexine V-FITC combinée à un triple marquage CD3/CD8/NKR après 48 heures de culture des PBMCs totaux de patients ou d'individus contrôles en présence de PHA (2µg/ml). Les valeurs sont celles d'un marquage représentatif et représentent le pourcentage de cellules positives parmi les cellules T CD8⁺ exprimant, ou n'exprimant pas, des KIRs (CD158a,h + CD158b,j) (A) ou NKG2A (B). Les résultats indiquent une baisse de la sensibilité à l'apoptose induite par l'activation dans l'ensemble des sous populations, y compris pour les cellules T CD8⁺ NKR⁻.

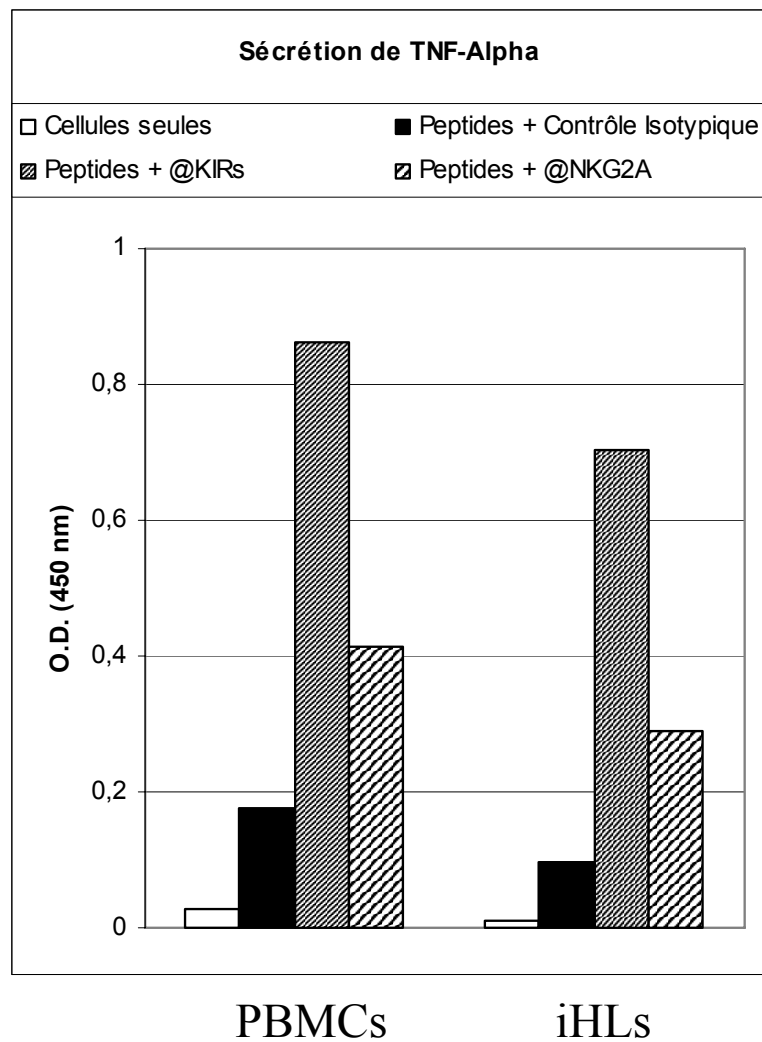


Figure C3 : Les récepteurs de molécules HLA Classe I exprimés sur les lymphocytes T CD8⁺ des patients sont fonctionnels.

Les histogrammes représentent la sécrétion de TNF- α par les PBMCs et les cellules lymphocytes intrahépatiques (iHLs) d'un patient HLA-A*02⁺ après 16 heures de culture en présence d'un cocktail de peptides du VHC présentables par HLA-A2.

Les résultats montrent que le blocage des interactions KIRs-ligands et NKG2A-ligand augmente l'activation induite par des antigènes du VHC et indiquent donc que les récepteurs inhibiteurs NKG2A et KIRs exprimés sur les cellules T CD8⁺ des patients sont fonctionnels.

L'effet des anticorps (5 μ g/ml) anti-NKG2A (Z199) ou anti-KIRs (EB6 + GL183) est contrôlé par un anticorps irrelevant de même isotype (IgG1). Les surnageants ont été testés pour la présence de TNF- α par ELISA. A cause du faible nombre d'iHLs obtenus par biopsie, les iHLs utilisés correspondent aux cellules qui ont été cultivés de façon non spécifique pendant quelques semaines (voir méthodes). Des PBMCs autologues déplétés en cellules T par panning ont été ajoutés avec les peptides pour favoriser la présentation aux iHLs. Les peptides utilisés (3-5 μ g/ml) correspondaient à un mélange de Core35-44, 90-98, 131-140, 156-165 et 177-185 et NS31073-1081, 1131-1139, 1169-1177, 1284-1298, 1406-1415, 1443-1451 et 1585-1593.

Article 2

Altered Distribution of Natural Killer Cell Subsets in Patients with Chronic Hepatitis C.

Paula Bonorino, Vincent Leroy, Martine Pernollet, Jean-Pierre Zarski, Patrice N. Marche and Evelyne Jouvin-Marche.

Soumis pour publication

Altérations de la Distribution des Cellules Natural Killer (NK) chez les Patients Atteints d'Hépatite Virale C Chronique.

La fragilité de patients déficients en fonction NK vis à vis des infections virales mais aussi les mécanismes retenus par certains virus et qui leur permet d'échapper à la réponse NK illustrent l'importance de ces cellules dans la résistance aux attaques virales. Le virus de l'hépatite C peut influencer la réponse NK de plusieurs façons. On sait que la protéine d'enveloppe E2 du VHC peut se lier aux molécules CD81 présentes sur les cellules NK et conduire à de fortes inhibitions de la capacité de ces cellules à s'activer, à proliférer et à exercer leur fonction de lyse et de sécrétion de cytokines. Un autre exemple concerne les protéines non structurales NS3 et 4A qui empêchent une bonne activation de l'Interferon regulatory factor (IRF)3 qui est un facteur important pour la production optimale d'Interférons de type I qui sont des activateurs de cellules NK. On sait aussi que le VHC ne réduit pas l'expression de molécules classiques HLA classe I sur les cellules infectées mais au contraire a tendance à augmenter cette expression ce qui rend ces cellules peu susceptible d'activer les cellules NK par la voie du « soi absent ». A cela s'ajoute une forte expression de HLA-E par de nombreux types cellulaires dans le foie infecté de façon chronique par le VHC. Etant donné que beaucoup de cellules NK expriment l'hétérodimère inhibiteur CD94:NKG2A, le foie des patients VHC+ est certainement une source importante de signaux d'inhibition pour de nombreuses cellules NK. L'ensemble de ces facteurs est à priori en défaveur d'une réponse NK efficace contre l'infection par le VHC.

Bien qu'il n'y ait pas de consensus général, plusieurs études ont suggéré une altération de la capacité cytotoxique des cellules NK chez les patients atteints d'hépatite virale C chronique. Pour notre part, nous avons souhaité examiner la distribution de sous populations de cellules NK chez ces patients HCc ainsi que les possibles associations entre la répartition de ces populations et les paramètres cliniques de la maladie. Nous avons observé une baisse de la fréquence des cellules NK circulante chez les malades avec une modification de représentation des sous types CD56^{dim} et CD56^{bright}. Dans le foie, la fréquence des cellules NK apparaît bien inférieure à celle caractérisant un foie humain normal et la proportion de certaines sous fraction de cellules NK après distinction par expression de récepteur KIRs semble diminuée. Enfin, nous avons observé une association positive entre la fréquence de cellules NK NKG2A⁺CD56^{bright} du sang et la sévérité des lésions et de la fibrose. Ces résultats documentent de multiples altérations de la représentation de sous populations de cellules NK au cours de l'hépatite C chronique.

Altered Distribution of Natural Killer Cell Subsets in Patients with Chronic Hepatitis C.

Paula Bonorino¹, Vincent Leroy^{1,2}, Martine Pernellet^{1,3}, Jean-Pierre Zarski^{1,2}, Patrice N. Marche^{1,2} and Evelyne Jouvin-Marche¹.

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 548; Commissariat à l’Energie Atomique – DRDC; Université Joseph Fourier, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

²Service d’Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble, La Tronche, France.

³Etablissement Français du Sang (EFS) Rhône-Alpes Grenoble, La Tronche, France.

Running title: NK cells in chronic Hepatitis C.

Keywords: chronic Hepatitis C, NK cells, NKRs

Summary

In most cases, infection with Hepatitis C virus (HCV) is not resolved by the immune system and leads to persistent liver disorders. Despite recent investigation, our knowledge of Natural Killer (NK) cell features during chronic hepatitis C (cHC) remains fragmentary. In this study we observed a reduced frequency of circulating NK cell in cHC patients compared to healthy controls along with an altered CD56^{bright}/CD56^{dim} subset ratio. Within the diseased liver, the fraction of resident NK cells was low and nearly correlated positively with the extend of fibrosis. As to NK cell subpopulations distinguished by the expression of HLA class I specific NK receptors, there was a detectable increase in the frequency of cells with surface expression of CD94 among both blood and liver NK cells in patients. In addition, the fraction of NK cells expressing CD158a,h was low among intrahepatic lymphocytes relative to blood cells. This trend contrasted with the converse distribution that characterizes healthy subjects. Finally, the frequency of circulating NKG2A⁺CD56^{bright} NK cells positively correlated with the extend of liver fibrosis and necroinflammation. These observations reveal overt alterations in the distribution of NK cell subsets in persistent HCV infection and suggest that the fine analysis of the CD56^{bright} circulating NK cell pool might be of interest for disease monitoring.

Introduction

The various strategies that many viruses have evolved to evade natural killer (NK) cell effector functions illustrate the central role for these cells in early host defence against viral infections (Orange, Fasset et al. 2002; Lodoen and Lanier 2005). In the case of the hepatitis C virus (HCV), it is for instance known that the HCV envelope protein E2 reacts to the CD81 molecule that is surface expressed on NK cells resulting in impaired NK cell proliferation, cytokine secretion and cytolytic activity (Pileri, Uematsu et al. 1998; Crotta, Stilla et al. 2002; Tseng and Klimpel 2002). Via the NS3/NS4A serine protease complex, HCV also inhibits the activation of Interferon regulatory factor (IRF)3 (Foy, Li et al. 2003), a factor essential for the efficient production of type 1 Interferons (IFNs) that, among other effects, can activate NK cells. In the same line, E2 and NS5A from certain HCV genotypes interfere with the function of the PKR kinase that is important for early release of type 1 IFNs in response to RNA viruses (Gale, Korth et al. 1998; Taylor, Shi et al. 1999). Finally, while many viruses cause the down regulation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules expression on infected cells, HCV infection induces a sustained HLA class I expression by ensuring that a large pool of peptides is abundantly available for binding to, and therefore stabilize, HLA class I molecules (Herzer, Falk et al. 2003). Altogether, these factors are suspected to promote the resistance of HCV-infected cells to NK cell response that otherwise might be able to contribute to the control HCV infection as suggested by the inhibitory effect of NK cells on HCV replication in cultured human hepatocytes (Li, Zhang et al. 2004) and, possibly, by the fact that spontaneous clearance of HCV can be observed in chimpanzee without concomitant signs of effective virus-specific adaptive immune response (Thomson, Nascimbeni et al. 2003).

While several studies have been conducted regarding the functional potential of NK lymphocytes under condition of persistent HCV infection (Corado, Toro et al. 1997;

Duesberg, Schneiders et al. 2001; Lirussi, Beccarello et al. 2002; Par, Rukavina et al. 2002; Lin, Gonzalez et al. 2004; Meier, Owen et al. 2005; Morishima, Paschal et al. 2006), less has been done with respect to examination of their population complexity, in particular in term of subsets defined by HLA class I specific NK receptors (NKR) expression. Here, we examined the expression of HLA class I reactive NKRs belonging to both the immunoglobulin-like and the C-type lectin families, by circulating and liver-infiltrating NK cells from patients with persistent HCV infection. We then searched for possible relationship between subsets distribution and clinical parameters of the disease.

Patients and Methods

Patients.

Patients with histologically proven persistent HCV infection (Service d' Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Grenoble) were analyzed (see Table I for demographic and clinical characteristics). All patients were anti-HCV antibody positive (ELISA 3, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA) and HCV-RNA positive by RT-Q-PCR (Amplicor HCV, Roche Diagnostic Systems, Meylan, France). HCV genotype was determined by Inno-Lipa technology (Innogenetics, Zwijnaarde, Belgium). All patients were negative for detectable presence of antibodies to HIV and hepatitis B surface antigen and their alcohol consumption was lower than 30g/day. Ferritin, α 1 antitrypsin and ceruloplasmin levels were normal. Patients underwent needle liver biopsy as part of their diagnostic evaluation. None of the patients had biochemical markers of autoimmune hepatitis and none had received antiviral therapy at the time of the liver biopsy. Peripheral blood from patients were collected in heparinized vacutainer tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by using Ficoll-hypaque density gradient separation and washed. The study was in agreement with the local ethics committee recommendations and all patients gave a written informed consent. Blood samples from healthy volunteers were obtained from the regional Etablissement Français du Sang (EFS) (La Tronche, France).

Isolation of intrahepatic cells.

Liver biopsies obtained using 1.5 mm diameter disposable biopsy needle were divided for histopathological examination (Metavir scoring system) and immunological analysis. For cell suspension analysis, fresh fragments collected in RPMI 1640 10 % AB human serum were washed several times, gently shaken in media to minimize blood cells contamination and disrupted mechanically into small pieces in complete media. The pieces were reduced to cell suspension in 1 ml complete media by using a glass mortar. Cells were washed, resuspended in complete media and processed immediately for analysis.

Monoclonal antibodies.

The monoclonal antibodies used for immunophenotyping were anti-CD3-R-Phycoerythrin (PE)Cy5 (UCHT1), and anti-CD56-PE (NCAM16.2), from Becton-Dickinson Biosciences (Le Pont de Claix, France). Anti-CD158a,h-PE (EB6), anti-CD158b1,b2,j-PE (GL183), anti-NKG2A(CD159A)-PE (Z199) and anti-CD94-PE (HP3B1) were obtained from Beckman Coulter France (Villepinte, France).

Immunostaining and Flow Cytometry.

Freshly isolated PBMC or intrahepatic samples (0.2 to 1×10^6 cells) were immunostained by incubating with a saturating amount of appropriate labelled antibodies in phosphate buffered saline (PBS) for 30 min in the dark at 4°C . Cells were washed twice and analyzed immediately. Multi-parameter flow cytometric analysis was performed on a FACSCalibur instrument with the CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Nonviable cells were excluded by electronic gating using forward and side scatter measurements. Color compensation between the distinct fluorochromes was set with single fluorochrome-stained cells from the same sample. Depending on the conditions, between 20.000 and 200.000 gated events were acquired.

Statistical methods

Statistical analysis was performed using the SPSS 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). *P* values shown for the analysis of the frequency of NKR expressing cells between patients and controls were calculated by using the nonparametric Mann-Whitney U-test. Within-group comparisons were evaluated using the Wilcoxon signed rank's test. Bivariate correlations were done by computing a Spearman's correlation coefficient. All comparisons were 2-tailed. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Results and discussion

Decreased frequency of circulating and intrahepatic NK cells in patients with persistent HCV infection.

During the course of a study focusing on conventional CD8⁺ T cells in patients with chronic hepatitis C (cHC), we did notice that the proportion of circulating CD3⁻CD56⁺ (i.e. Natural Killer) lymphocytes appeared to be decreased relative to blood samples from healthy donors (median value: 8.6 % versus 13 %, $p = 0.03$) (**Figure 1**). Among circulating NK cells, it is known that the surface expression level of CD56 identifies two subsets with important functional distinctions. While the vast majority of NK cells display a moderate level of CD56 (CD56^{dim}) and a marked cytotoxicity potential, a small proportion harbor a high CD56 expression level (CD56^{bright}) and a greater capacity to secrete cytokines (Lanier, Le et al. 1986; Cooper, Fehniger et al. 2001; Cooper, Fehniger et al. 2001; Jacobs, Hintzen et al. 2001). We therefore asked whether there was a variation in the distribution of CD56^{dim} and CD56^{bright} cells among total blood NK cells in patients. Among the NK cell pool, the frequency of CD56^{bright} cells was found increased and that of CD56^{dim} cells reduced when compared to controls (10 % versus 6 %, $p = 0.041$ and 90 % versus 94 %, $p = 0.035$ respectively, **Figure 1**). These observations are indeed supported by independent studies (Lin, Gonzalez et al. 2004; Meier, Owen et al. 2005; Morishima, Paschal et al. 2006). The augmented frequency of CD56^{bright} cells could have reflected a substantial expansion of this NK cell subset in patients. However, because the overall CD3⁻CD56⁺ population frequency was lower in patients, the modified CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cell proportions suggest an altered persistence of CD56^{dim} NK cells rather than the sole expansion of the CD56^{bright} NK cell subset. The fraction of blasting (FSC^{high}) blood NK cells was indeed limited in patients (median 1.07 %; range: 0.34-5.9) and a massive expansion of a particular NK cell subset might be limited in cHC patients given the potent negative constraint that the HCV E2-CD81

interaction can exert on NK cell proliferation (Crotta, Stilla et al. 2002). In keeping with the notion of an altered maintenance of CD56^{dim} NK cells is the fact that an increased susceptibility of CD56^{dim} NK cells to apoptosis can be observed in the proinflammatory context associated distinct infectious disease (Schierloh, Yokobori et al. 2005). Besides, even in healthy individuals, there are clearly more apoptotic cells among circulating activated NK cells of the CD56^{dim} subset than among their CD56^{bright} counterparts (Lin, Gonzalez et al. 2004) suggesting that a differential susceptibility to cell death is a natural feature of these two subsets. Finally, it can not be excluded that under the conditions of HCV chronic infection, a fraction of CD56^{bright} cells represent CD56^{dim} cells that have modified their characteristics since NK cell subsets can show signs of substantial plasticity depending on environmental stimuli (Perussia, Chen et al. 2005). While liver-infiltrating CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cell frequencies were difficult to determine with accuracy in many patients due to the very low absolute number of infiltrating lymphocytes recovered from biopsies, the proportion of total intrahepatic CD3⁻CD56⁺ lymphocytes appeared consistently lower than that of their circulating counterparts (6 % versus 8.6%, $p = 0.041$). This is in sharp contrast with the two to three fold increase in the frequency of liver NK cells relative to the blood compartment that is reported for healthy individuals (Hata, Van Thiel et al. 1992; Norris, Collins et al. 1998; Doherty, Norris et al. 1999; Ishiyama, Ohdan et al. 2006). Thus, besides alterations in the composition of the blood NK cell pool, our results point to a marked reduction of the intrahepatic NK cell population in patients with chronic hepatitis C.

Relationship between the frequency of intrahepatic NK cells and the extend of liver fibrosis.

When considered in terms of possible association with clinical parameters such as necroinflammation score, fibrosis score, ALAT level and viremia, the frequency of blood NK cells (as a whole or upon distinction by CD56 expression level) did not reveal any statistically significant correlation (**Table II**). In contrast, we noticed that the frequency of CD3⁻CD56⁺

lymphocytes remaining in the inflamed liver showed a moderate and positive correlation with the intensity of fibrosis (as defined by the Metavir Fibrosis score) that was very close to statistical significance ($r = 0.50$, $p = 0.0501$). As to lesion severity, ALAT level and viral load, we did not notice any sign of association (not shown). Hence, the data suggest a possible positive association between the remaining fraction of intrahepatic NK lymphocytes and the extend of fibrosis within the diseased liver.

At first, such an relationship might seem counter-intuitive because recent works in mouse models point to a negative control of fibrosis development by NK cells through the killing of activated hepatic stellate cells (HSC) (Melhem, Muhanna et al. 2006; Radaeva, Sun et al. 2006) that are major contributors to deposition of extracellular matrix proteins and therefore, to fibrogenesis. It is possible however, that functional alterations of NK cells render such a regulation phenomenon inefficient under conditions of persistent HCV infection. For instance, although their long term cytotoxicity potential was found normal (Duesberg, Schneiders et al. 2001), several studies have revealed some degree of alteration of the cytolytic activity of NK cells from cHC patients (Corado, Toro et al. 1997; Lirussi, Beccarello et al. 2002; Lin, Gonzalez et al. 2004; Meier, Owen et al. 2005). The observation that the cytotoxic activity of blood NK cells was negatively correlated with the fibrosis score (Morishima, Paschal et al. 2006) is, in fact, compatible with the notion of a deficient NK cell cytolytic potential during disease progression. In addition to intrinsic functional alterations, *in situ* negative regulation of NK cell activity could play a role. For exemple, during persistent HCV infection, the inflamed liver microenvironment is characterized by an enhanced expression level of HLA-E on multiple cell types. HLA-E expression is stabilized through its binding to HCV core₃₅₋₄₄ peptide and is able to effectively inhibit NK cell cytotoxicity via interaction with CD94-NKG2A inhibitory receptor (Nattermann, Nischalke et al. 2005) that is expressed by a sizable pool of NK cells. Finally, as mentioned above, HCV E2 has the capacity to negatively

regulate the activation and proliferation of NK cells (Pileri, Uematsu et al. 1998; Crotta, Stilla et al. 2002; Tseng and Klimpel 2002). One or more of such negative regulatory factors are likely to prevent the efficient targeting of activated HSCs by liver resident NK cells and, as a consequence, to allow fibrogenesis to proceed unperturbed. As to the positive correlation we observe in this study, it is possible that some cell-cell interaction(s) and/or cytokine(s) produced locally in the inflamed liver causes a certain level of selective persistence/retention of intrahepatic NK cells. Regarding such a possibility, an increase in IL-15 production by kupffer cells and infiltrating monocytes within the HCV-infected liver microenvironment was reported (Golden-Mason, Kelly et al. 2004) and it is known that IL-15 is an efficient positive regulator of NK lymphocyte survival (Carson, Fehniger et al. 1997). Further work is thus needed to better understand the relationships between liver NK cell distribution and histological characteristics of the tissue.

Analysis of HLA class I specific receptors expression by NK cells in cHC.

Because the NK cell population was under-represented in patients persistently infected with HCV and since HLA class I specific NK cell receptors can greatly modulate the activity, as well as the general biology, of NK cells (Moretta, Biassoni et al. 2002; Moretta, Bottino et al. 2002; Lanier 2005), we analyzed circulating NK cells from cHC patients for surface expression of CD94, NKG2A and members of the KIRs family of NKRs (CD158a/h and CD158b/j KIRs). Relative to blood from healthy donors we found a detectable increase in the frequency of NK cells with surface expression of CD94 in cHC patients (**Figure 2**). To this respect, it is of interest to note that CD94 expression by NK cells appears to correlate well with a reduced susceptibility to cell death (Gunturi, Berg et al. 2003). Thus, CD94⁺ NK cells might be characterized by a better persistence under the inflammatory conditions of chronic HCV infection. Indeed, an increase in CD94⁺ NK cell frequency has been observed by Jinushi

M. et al., (Jinushi, Takehara et al. 2004) who also noticed an increase in the frequency of NKG2A positive NK cells. The reason for which we did not detect the latter trend in this study is at present unclear. When subdividing NK cells based on CD56 surface expression level, we did not find significant differences between patients and controls (not shown). As to HLA class I specific NKRs expression by intrahepatic NK cells from cHC patients, we noticed that CD94 and NKG2A were expressed by comparable frequency of liver and blood NK cells whereas the frequency of both CD158a,h⁺ and CD158b,j⁺ NK cells were significantly higher among circulating lymphocytes relative to liver infiltrating lymphocytes (**Figure 2**). Given that in healthy individuals, the median percentage of CD94⁺ NK cells is clearly lower in the liver than in the blood and that the median frequency of CD158a,h⁺ NK cells is higher in the liver than in the blood (Yuen and Norris 2001), our findings reveal substantial modifications in the tissue distribution of these NK cell subsets in patients with persistent HCV infection. In particular, the data point to an increase in the fraction of CD94⁺ cells and a reduction of the proportion of CD158a,h⁺ cells among liver infiltrating NK lymphocytes from cHC patients.

The frequency of circulating NKG2A⁺ NK cells negatively correlates with viremia.

When expression of HLA class I specific NK cell receptors on total blood NK cells was considered in the context of clinical parameters, the only clear relationship that emerged was a negative association between the frequency of NKG2A⁺NK cells and the viral load in the serum (**Table III**). A comparable negative correlation was detectable when the analysis was restricted to the blood CD56^{dim} subset ($r = -0.419$, $p = 0.0494$). A similar search for possible associations between liver infiltrating NK cell subsets and clinical parameters did not yield significant results (not shown). Possibly, the negative relationship we found between NKG2A⁺NK cell frequency and viremia might partially explain (through the heterogeneity of

the viremia parameter within the distinct cohorts studied) the fact that unlike others, (Jinushi, Takehara et al. 2004), we did not observe a significant increase in the frequency of circulating NKG2A⁺NK cells in cHC patients (see **Figure 2**).

The frequency of circulating NKG2A⁺CD56^{bright} NK cells positively correlates with both fibrosis and necroinflammation scores.

Looking at CD56^{dim} and CD56^{bright} populations of circulating NK cells upon stratification according to HLA class I specific NK cell receptor expression, we found that the percentage of CD56^{bright} NK cells with NKG2A expression was positively associated with the severity of both necroinflammation and fibrosis in patients (**Table IV**). No significant association was found when analyzing data related to the CD56^{dim} subset (not shown). Due to their cytotoxic nature, NK lymphocyte could theoretically be involved in the development of liver damages and eventually of fibrogenesis as suggested by studies from mouse models (Liu, Govindarajan et al. 2000; Ochi, Ohdan et al. 2004). However, a substantial direct contribution of NK cells to liver lesions in patients is not clearly established according to current models of cHC pathogenesis (Golden-Mason and Rosen 2006). Besides possible intrinsic functional defects (Corado, Toro et al. 1997; Lirussi, Beccarello et al. 2002; Lin, Gonzalez et al. 2004; Meier, Owen et al. 2005) and plausible in situ negative regulation (Pileri, Uematsu et al. 1998; Crotta, Stilla et al. 2002; Tseng and Klimpel 2002; Herzer, Falk et al. 2003; Nattermann, Nischalke et al. 2005), the histological analysis of biopsy samples from patients with chronic active hepatitis C (Fiore, Angarano et al. 1997) did not suggest a marked contribution of NK cells to the immune mechanism of liver injury. Finally, there appears to be less activated blood NK cells in cHC patients than in control subjects (Lin, Gonzalez et al. 2004), an observation that does not support the idea of a general NK cell activation during cHC. Possibly, the positive association we found between the percentage of NKG2A-expressing

CD56^{bright} NK cells and the severity of necroinflammation/fibrosis Metavir scores could suggest that the proinflammatory context associated with enhanced liver damage favors the preferential survival of NKG2A⁺ cells among CD56^{bright} NK cells from patients. This is consistent with the fact that NKG2A expression is dependent on CD94 and that high level of CD94 expression (a well established feature of CD56^{bright} NK cells) is associated with an enhanced resistance of NK lymphocytes to cell death (Gunturi, Berg et al. 2003). In addition, Lin *et al.*, observed a positive correlation between the fraction of activated CD56^{bright} blood NK cells and necroinflammatory grade in cHC patients (Lin, Gonzalez et al. 2004). Together with the latter study, our data suggest that blood CD56^{bright} NK cells might potentially represent a subpopulation of great interest to follow the evolution of histological parameters in persistent HCV infection. Additional examinations of the properties of CD56^{bright} NK cells in cHC patients appear therefore needed to validate such a potential.

In summary, we report here a reduced frequency of circulating NK cell in cHC patients along with an altered CD56^{bright}/CD56^{dim} subset ratio. The frequency of liver resident NK cells was rather low and correlated positively with the fibrosis score. Upon analysis of NK cells distinguished by the surface expression of HLA class I specific receptors, we found indications of altered distribution for both CD94-expressing and CD158a,h-expressing NK cells. Finally, there was a positive relationship between the frequency of circulating NKG2A⁺ CD56^{bright} NK cells and the severity of both fibrosis and necroinflammation. Collectively, our observations reveal major alterations in the distribution of NK cell subsets in cHC patients and emphasize the need for a better understanding of CD56^{bright} NK cells features in persistent HCV infection.

Acknowledgements

We are grateful to the patients who enrolled in this study for their cooperation. We thank the Etablissement Français du Sang (EFS) Rhône-Alpes Grenoble (La Tronche, France) for blood samples from healthy individuals. We also thank T. Dufeu-Duchesne for advices and C. Viret and M. Faure for discussions.

Footnotes:

This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and a specific grant from the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS). P.B. was supported by fellowships from the french government and from the ANRS.

Corresponding author: Dr. E. Jouvin-Marche, CEA DRDC and INSERM U548, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble cedex 9 (France) ; Tel: (33) 4 38 78 38 73; Fax: (33) 4 38 78 98 03; E mail: immuno@dsvsud.cea.fr

Table I: Demographic and clinical characteristics of chronically HCV-infected patients included in the present study (n = 32).

Female Sex*	11	(34 %)
Age (years)**	48 (28-75)	
<i>Source of infection*</i>		
Intravenous drug abuse	13	(41 %)
Transfusion	10	(31 %)
Other modes	3	(9 %)
Unknown	6	(19 %)
Duration of infection (years)**	23 (3-51)	
Plasma Viral load (log IU/ml) **	6.09 (5.57-6.95)	
<i>Viral genotype*</i>		
1	19	(59 %)
2	5	(16 %)
3	4	(13 %)
4	2	(6 %)
ND	2	(6 %)
ALT (IU/ml)**	62 (22-253)	
<u>Liver Histology*</u>		
<i>Metavir activity score</i>		
1	15	(47 %)
2	11	(34 %)
3	4	(13 %)
ND	2	(6 %)
<i>Metavir fibrosis score</i>		
0	2	(6 %)
1	13	(41 %)
2	8	(25 %)
3	3	(9 %)
4	5	(16 %)
ND	1	(3 %)

* Number of cases/total (percentage %)

** Median (range)

ND : not determined

IU/ml : international units per mililiter

ALT : alanine aminotransferase

Note that for technical reasons (number of cells available per sample), the entire set of experiments described could not be performed for every single patient.

Table II: Frequency of circulating NK cells in cHC patients relative to clinical parameters.

	MET. ACT. ⁽¹⁾	MET. FIB. ⁽²⁾	ALAT ⁽³⁾	VIREMIA
% CD3-CD56+	r = 0.302 p = 0.123	r = 0.164 p = 0.394	r = - 0.02 p = 0.921	r = - 0.061 p = 0.748
% CD56 ^{dim} within CD3-CD56+	r = 0.150 p = 0.443	r = - 0.192 p = 0.319	r = 0.281 p = 0.168	r = 0.158 p = 0.448
% CD56 ^{bright} within CD3-CD56+	r = 0.036 p = 0.854	r = 0.29 p = 0.131	r = -0.274 p = 0.180	r = - 0.159 p = 0.446

⁽¹⁾ Metavir Activity score.

⁽²⁾ Metavir Fibrosis Score.

⁽³⁾ Alanin aminotransferase.

Table III: Frequency of circulating NK cell subsets in cHC patients relative to clinical parameters.

	MET. ACT. ⁽¹⁾	MET. FIB. ⁽²⁾	ALAT ⁽³⁾	VIREMIA
% CD158a,h+	r = - 0.192 p = 0.328	r = - 0.220 p = 0.252	r = - 0.157 p = 0.443	r = - 0.06 p = 0.77
% CD158b,j+	r = - 0.107 p = 0.585	r = - 0.325 p = 0.091	r = 0.034 p = 0.867	r = 0.137 p = 0.512
% NKG2A+	r = 0.205 p = 0.314	r = 0.316 p = 0.113	r = 0.233 p = 0.274	r = - 0.528 p = 0.0133*
% CD94+	r = - 0.185 p = 0.374	r = - 0.163 p = 0.423	r = 0.179 p = 0.412	r = - 0.243 p = 0.276

⁽¹⁾ Metavir Activity score.

⁽²⁾ Metavir Fibrosis Score.

⁽³⁾ Alanin aminotransferase

* $p < 0.05$

Table IV: Frequency of circulating NKR+CD56^{bright} NK cells in cHC patients relative to clinical parameters.

	MET. ACT. ⁽¹⁾	MET. FIB. ⁽²⁾	ALAT ⁽³⁾	VIREMIA
% CD158a,h+	r = - 0.324 p = 0.098	r = - 0.267 p = 0.166	r = - 0.226 p = 0.267	r = 0.047 p = 0.821
% CD158b,j+	r = - 0.299 p = 0.127	r = - 0.187 p = 0.331	r = - 0.170 p = 0.405	r = 0.117 p = 0.575
% NKG2A+	r = 0.58 p = 0.0045**	r = 0.48 p = 0.016*	r = 0.039 p = 0.854	r = - 0.091 p = 0.677
% CD94+	r = 0.047 p = 0.823	r = 0.16 p = 0.433	r = - 0.058 p = 0.791	r = 0.058 p = 0.796

⁽¹⁾ Metavir Activity score.

⁽²⁾ Metavir Fibrosis Score.

⁽³⁾ Alanin aminotransferase

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

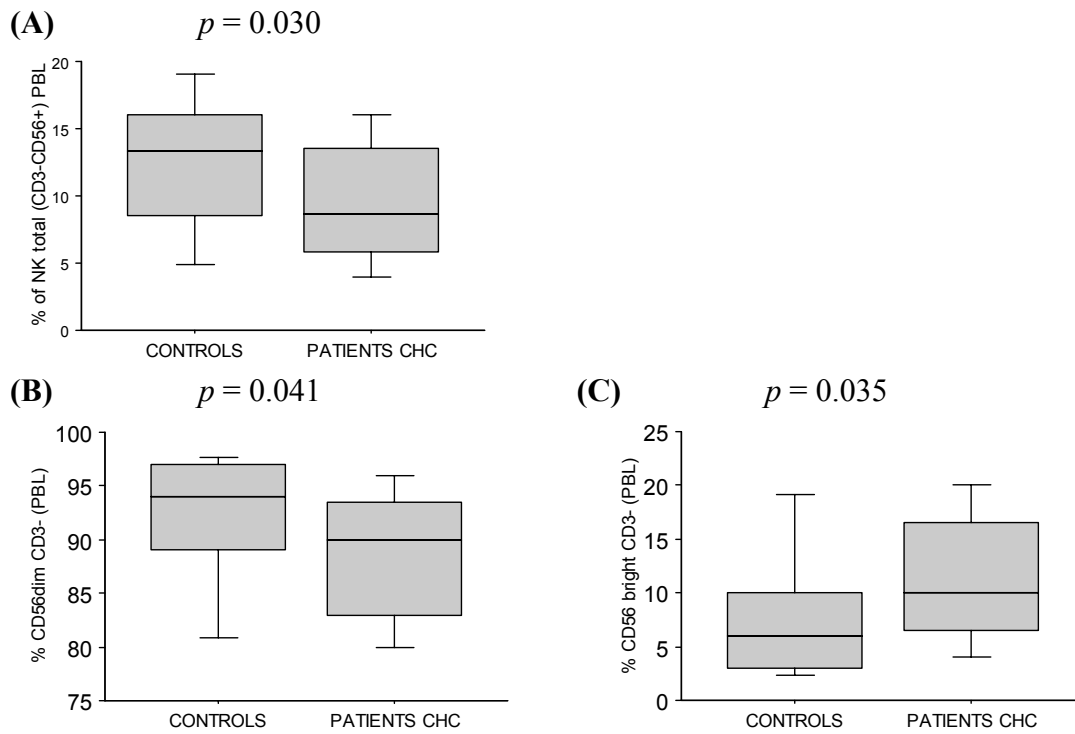
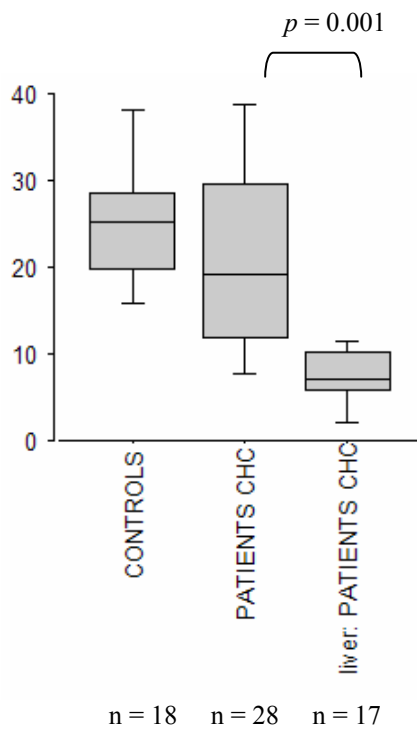


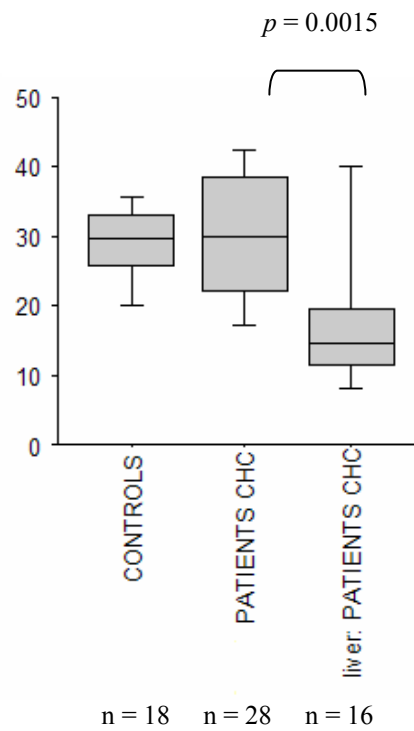
Figure 1: Frequency of circulating NK cells in cHC patients.

The frequency of circulating (A) total NK cells (CD3-CD56+) (B) CD56^{dim} within CD3-CD56+ (C) CD56^{bright} within CD3-CD56+ was evaluated by immunostaining and flow cytometry for controls (n=18) and patients with chronic Hepatitis C (patients CHC) (n=28). Data are represented as boxplots showing medians (horizontal lines), upper and lower quartiles (boxes) and extreme values (whiskers).

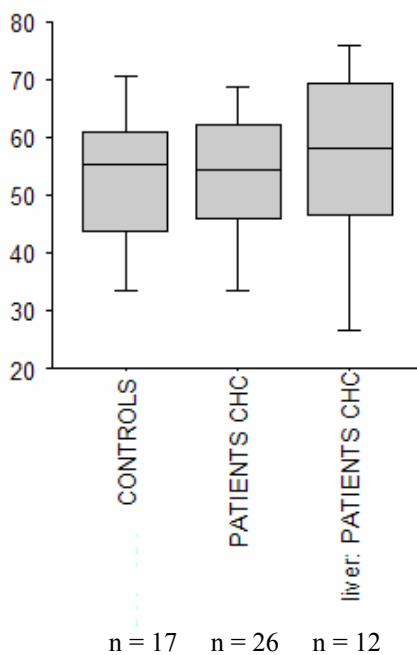
(A) CD158a,h



(B) CD158b,j



(C) NKG2A



(D) CD94

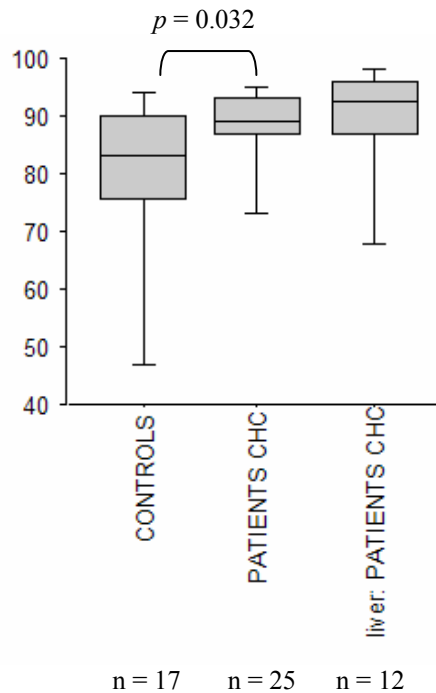


FIGURE 2: Frequency of NKR+ cells within the total NK population (CD3-CD56+)

The frequency of **(A)** CD158a,h+ **(B)** CD158b,j+ **(C)** NKG2A+ **(D)** CD94+ cells within the total NK population (CD3-CD56+) was analysed in circulating lymphocytes for controls and patients CHC and in intrahepatic lymphocytes for CHC patients (liver patients CHC) by immunostaining and flow cytometry.

References

- Carson, W. E., T. A. Fehniger, et al. (1997). "A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival." *J Clin Invest* **99**(5): 937-43.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* **22**(11): 633-40.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." *Blood* **97**(10): 3146-51.
- Corado, J., F. Toro, et al. (1997). "Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection." *Clin Exp Immunol* **109**(3): 451-7.
- Crotta, S., A. Stilla, et al. (2002). "Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein." *J Exp Med* **195**(1): 35-41.
- Doherty, D. G., S. Norris, et al. (1999). "The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns." *J Immunol* **163**(4): 2314-21.
- Duesberg, U., A. M. Schneiders, et al. (2001). "Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C." *J Hepatol* **35**(5): 650-7.
- Fiore, G., I. Angarano, et al. (1997). "In-situ immunophenotyping study of hepatic-infiltrating cytotoxic cells in chronic active hepatitis C." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **9**(5): 491-6.
- Foy, E., K. Li, et al. (2003). "Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease." *Science* **300**(5622): 1145-8.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1998). "Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance." *Clin Diagn Virol* **10**(2-3): 157-62.
- Golden-Mason, L., A. M. Kelly, et al. (2004). "Hepatic interleukin 15 (IL-15) expression: implications for local NK/NKT cell homeostasis and development." *Clin Exp Immunol* **138**(1): 94-101.
- Golden-Mason, L. and H. R. Rosen (2006). "Natural killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies?" *Liver Transpl* **12**(3): 363-72.
- Gunturi, A., R. E. Berg, et al. (2003). "Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94." *J Immunol* **170**(4): 1737-45.
- Hata, K., D. H. Van Thiel, et al. (1992). "Phenotypic and functional characteristics of lymphocytes isolated from liver biopsy specimens from patients with active liver disease." *Hepatology* **15**(5): 816-23.
- Herzer, K., C. S. Falk, et al. (2003). "Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity." *J Virol* **77**(15): 8299-309.
- Ishiyama, K., H. Ohdan, et al. (2006). "Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans." *Hepatology* **43**(2): 362-72.
- Jacobs, R., G. Hintzen, et al. (2001). "CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells." *Eur J Immunol* **31**(10): 3121-7.
- Jinushi, M., T. Takehara, et al. (2004). "Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection." *J Immunol* **173**(10): 6072-81.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." *Annu Rev Immunol* **23**: 225-74.
- Lanier, L. L., A. M. Le, et al. (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *J Immunol* **136**(12): 4480-6.

- Li, Y., T. Zhang, et al. (2004). "Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression." J Leukoc Biol **76**(6): 1171-9.
- Lin, A. W., S. A. Gonzalez, et al. (2004). "CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection." Clin Exp Immunol **137**(2): 408-16.
- Lirussi, F., A. Beccarello, et al. (2002). "Impaired Natural Killer cell cytotoxic activity in chronic hepatitis C viral infection: a single center, controlled study." Current Therapeutic Research **63**(11): 748-58.
- Liu, Z. X., S. Govindarajan, et al. (2000). "NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection." J Immunol **164**(12): 6480-6.
- Lodoen, M. B. and L. L. Lanier (2005). "Viral modulation of NK cell immunity." Nat Rev Microbiol **3**(1): 59-69.
- Meier, U. C., R. E. Owen, et al. (2005). "Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections." J Virol **79**(19): 12365-74.
- Melhem, A., N. Muhanna, et al. (2006). "Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC." J Hepatol.
- Moretta, L., R. Biassoni, et al. (2002). "Surface receptors that regulate the NK cell function: beyond the NK cell scope." Curr Top Microbiol Immunol **266**: 11-22.
- Moretta, L., C. Bottino, et al. (2002). "Human natural killer cells: their origin, receptors and function." Eur J Immunol **32**(5): 1205-11.
- Morishima, C., D. M. Paschal, et al. (2006). "Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing." Hepatology **43**(3): 573-80.
- Nattermann, J., H. D. Nischalke, et al. (2005). "The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells." Am J Pathol **166**(2): 443-53.
- Norris, S., C. Collins, et al. (1998). "Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes." J Hepatol **28**(1): 84-90.
- Ochi, M., H. Ohdan, et al. (2004). "Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice." Hepatology **39**(5): 1321-31.
- Orange, J. S., M. S. Fasset, et al. (2002). "Viral evasion of natural killer cells." Nat Immunol **3**(11): 1006-12.
- Par, G., D. Rukavina, et al. (2002). "Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection." J Hepatol **37**(4): 514-22.
- Perussia, B., Y. Chen, et al. (2005). "Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell." Mol Immunol **42**(4): 385-95.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science **282**(5390): 938-41.
- Radaeva, S., R. Sun, et al. (2006). "Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners." Gastroenterology **130**(2): 435-52.
- Schierloh, P., N. Yokobori, et al. (2005). "Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy." J Immunol **175**(10): 6852-60.
- Taylor, D. R., S. T. Shi, et al. (1999). "Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein." Science **285**(5424): 107-10.

- Thomson, M., M. Nascimbeni, et al. (2003). "The clearance of hepatitis C virus infection in chimpanzees may not necessarily correlate with the appearance of acquired immunity." *J Virol* **77**(2): 862-70.
- Tseng, C. T. and G. R. Klimpel (2002). "Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions." *J Exp Med* **195**(1): 43-9.
- Yuen, M. F. and S. Norris (2001). "Expression of inhibitory receptors in natural killer (CD3(-)CD56(+)) cells and CD3(+)/CD56(+) cells in the peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma." *Clin Immunol* **101**(3): 264-9.

Article 3

Characteristics and Subset Composition of CD8⁺ Natural Killer (NK) Cells in Patients with Chronic Hepatitis C.

Paula Bonorino, Vincent Leroy, Martine Pernollet, Jean-Pierre Zarski, Patrice N. Marche and Evelyne Jouvin-Marche.

Soumis pour publication.

Analyse de la Sous Population de Cellules NK Exprimant le Récepteur CD8 chez les Patients Chroniquement Infectés par le Virus de l'Hépatite C.

Chez l'homme, une fraction importante des cellules NK (jusqu'à 30-40 %) sont positives pour l'expression du récepteur CD8 classiquement exprimé sur les lymphocytes T cytotoxiques. Ces cellules (CD56⁺CD3⁺CD8⁺) expriment CD8 à leur surface à un niveau plus faible que les lymphocytes T CD8⁺ classiques. Des travaux suggèrent que ces cellules possèdent un potentiel cytotoxique supérieur à celui des autres cellules NK. Ce phénomène pourrait être dû à une meilleure résistance à la mort cellulaire qui accompagne l'activité lytique et donc permettre une activité cytotoxique plus soutenue. Comme indiqué précédemment, plusieurs études ont été conduites pour caractériser les cellules NK des patients atteints d'Hépatite virale C chronique. Cependant, dans la littérature disponible, il n'y a pas d'étude portant sur l'analyse des cellules NKCD8⁺ et leur relation avec les paramètres cliniques de la pathologie.

Nous avons donc examiné la distribution et les caractéristiques des cellules NKCD8⁺ isolées à partir du sang et du foie des patients. Les résultats n'ont pas révélé de distinctions phénotypiques importantes entre patients et contrôles. Par contre, la fréquence des cellules NKCD8⁺ est réduite chez les patients et leur répartition entre cellules CD56^{dim} et CD56^{bright} est également modifiée. Au niveau du foie, nous avons observé une corrélation positive entre la fréquence des cellules NKCD8⁺ qui infiltrent le tissu malade et le taux sérique des ALAT. Cette association s'est confirmée pour la fraction des NKCD8⁺ intrahépatiques positives pour l'expression de CD158b,j et est de plus, étendue aux paramètres histologiques (scores Metavir de lésion et de fibrose). Ces résultats montrent des modifications de distribution de la sous population NKCD8⁺ au cours de l'hépatite virale C chronique et révèlent des corrélations positives avec des paramètres cliniques majeurs de la maladie. Une contribution potentielle des cellules NKCD8⁺ intrahépatiques au développement des lésions est discutée.

Characteristics and Subset Composition of CD8⁺ Natural Killer (NK) Cells in Patients with Chronic Hepatitis C.

Paula Bonorino¹, Vincent Leroy^{1,2}, Martine Pernollet^{1,3}, Jean-Pierre Zarski^{1,2}, Patrice N. Marche^{1,2} and Evelyne Jouvin-Marche¹.

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 548; Commissariat à l'Énergie Atomique – DRDC; Université Joseph Fourier, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

²Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble, La Tronche, France.

³Etablissement Français du Sang (EFS) Rhône-Alpes Grenoble, La Tronche, France.

Running title: CD8⁺NK cells in chronic Hepatitis C.

Keywords: chronic Hepatitis C, CD8⁺NK cells, NKRs

Summary

The properties of Natural Killer cells have been the focus of many studies in patients chronically infected with Hepatitis C virus (HCV). In contrast, the features of the fraction of NK cells that surface express the CD8 co-receptor and are thought to possess an enhanced cytolytic potential, have not been analyzed. Here we have examined the distribution and characteristics of CD8⁺NK cells in the blood and liver of chronic hepatitis C patients. While there was no overt phenotypic distinction between circulating CD8⁺NK cells from patients and controls, the frequency of blood CD8⁺NK cells was found reduced in patients and among these cells, the CD56^{dim/bright} cell ratio was modified. As to CD8⁺NK cells that infiltrate the inflamed liver, there was a positive correlation between their frequency and the level of ALAT in the serum. Upon distinction by expression of distinct HLA class I specific receptors, we found that the frequency of intrahepatic CD8⁺NK cells expressing CD158b_j correlated positively with both histological parameters (activity and fibrosis) and ALAT level. A positive relationship with the fibrosis index was also observed for the CD56^{dim} fraction of liver infiltrating CD8⁺NK cells. Thus, during chronic hepatitis C, CD8⁺NK cells appear altered in their distribution and particular fractions of these cells show positive relationship with major clinical parameters of the disease. The results are discussed in the context of liver damage and immunopathogenesis.

Introduction

Natural Killer (NK) cells are important cells in early host responses to viral infections as evidenced both by the multiple strategies that viruses have evolved to escape their effector functions (Orange 2002; Orange, Fassett et al. 2002; Lodoen and Lanier 2005) and the susceptibility of patients with NK cell deficiencies to various viral infections (Orange 2002). NK cells can eliminate virus-infected cells through natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by using perforin and granzymes without the requirement of prior antigen sensitization. A sizable subset (up to 40%) of human NK cells surface expresses the CD8 receptor. CD8⁺NK cells express CD8 under the α/α homodimer configuration and at a reduced density (CD8^{dim}) relative to that of CD8 α/α or CD8 α/β dimers expressed on CD8⁺ T lymphocytes (Ortaldo, Sharrow et al. 1981; Griffin, Hercend et al. 1983; Lanier, Le et al. 1983; Perussia, Fanning et al. 1983; Parnes 1989; Robertson and Ritz 1990; Moebius, Kober et al. 1991). A remarkable feature of CD8⁺ NK cells is that their cytolytic potential appears to be enhanced when compared to that of their CD8⁻ counterparts (Srour, Leemhuis et al. 1990; Fuchshuber and Lotzova 1992; Addison, North et al. 2005). The high lytic potential of CD8⁺NK cells appears not to be linked to modified expression levels of effector molecules, regulatory receptors or adhesion molecules. Rather, it seems to rely on engagement of the CD8 α/α homodimer that promotes the sequential lysis of multiple target cells through increased resistance to cytotoxicity-induced cell death (Addison, North et al. 2005). Such a lytic activity as indeed been documented to be effective in vivo in leukaemia patients (Lowdell, Ray et al. 1997; Lowdell, Craston et al. 2002).

In the case of infection with the hepatitis C virus (HCV), a large majority of patients develop a persistent infection. While it appears that strong antiviral CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses are associated with virus clearance (Racanelli and Rehermann 2003; Shoukry,

Cawthon et al. 2004; Bowen and Walker 2005; Chisari 2005), the reasons underlying the progression to persistent infection are not fully understood. Such a failure to resolve acute infection often leads to liver damages due to regional immune response and severe inflammation. Chronic Hepatitis C (cHC) patients thus present lymphocyte infiltration in periportal and lobular areas as well as degenerative lobular lesions (Pawlotsky 2004). The role of NK cells in the pathogenesis of the disease is not well delineated. The fact that HCV evolved mechanisms to counteract NK cell response, for instance by inhibiting NK cell effector functions through envelope protein E2:CD81 interaction (Pileri, Uematsu et al. 1998; Crotta, Stilla et al. 2002; Tseng and Klimpel 2002), suggests that a potent NK cell response might well be instrumental in controlling acute HCV infection. However, despite intensive investigation, the characteristics of the NK cell compartment during persistent HCV infection are not clearly established. Many studies (Deignan, Curry et al. 2002; Par, Rukavina et al. 2002; Lin, Gonzalez et al. 2004; Meier, Owen et al. 2005; Morishima, Paschal et al. 2006), but not all (Corado, Toro et al. 1997), suggest alterations in NK cell frequency in cHC patients. In addition, no definitive consensus has been reached as to the cytolytic potential of NK lymphocytes in patients (Corado, Toro et al. 1997; Duesberg, Schneiders et al. 2001; Par, Rukavina et al. 2002; Meier, Owen et al. 2005).

Thus, despite recent investigation, the characteristics of the NK cell compartment from patients with persistent HCV infection are not clearly established and more work in this area is needed. For instance, there is a lack of information about the features and distribution of the CD8⁺ subset of NK cells in cHC. We have, in the present study, examined the status of CD8⁺ NK cells in untreated patients chronically infected with HCV.

Patients and methods

Patients.

Patients with histologically proven persistent HCV infection (Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Grenoble, Service d' Hépatologie-Gastroentérologie) were included in the study (see **Table I** for demographic and clinical features). All patients were anti-HCV antibody positive (ELISA 3, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA) and HCV-RNA positive by RT-Q-PCR (Amplicor HCV, Roche Diagnostic Systems, Meylan, France). HCV genotype was determined by Inno-Lipa technology (Innogenetics, Zwijnaarde, Belgium). The patients were negative for detectable presence of antibodies to HIV and hepatitis B surface antigen and their alcohol consumption was lower than 30g/day. Ferritin, α 1 antitrypsin and ceruloplasmin levels were normal. None of the patients had biochemical markers of autoimmune hepatitis and none had received antiviral therapy at the time of the liver biopsy was performed or peripheral blood sample was collected. Peripheral blood samples from patients were collected in heparinized vacutainer tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by using Ficoll-hypaque density gradient separation and washed. The study was in agreement with the local ethics committee recommendations and a informed consent was written by all patients. Blood samples from healthy donors were obtained from the regional Etablissement Français du Sang (EFS) (La Tronche, France).

Isolation of liver infiltrating cells.

Liver biopsies were obtained by using 1.5 mm diameter disposable biopsy needle and were divided for both histopathological examination (Metavir scoring system) and immunological analysis. For cell suspension analysis, fresh fragments collected in RPMI 1640 10 % AB human serum were washed multiple times, shaken into media to minimize blood cells contamination prior to mechanical dissociation into small pieces in complete media. The

fragments were reduced to cell suspension in 1 ml complete media by using a glass mortar. Cells were washed, resuspended in complete media and processed immediately for analysis.

Monoclonal antibodies.

The antibodies used for immuno-analysis were anti-CD3-R-Phycoerythrin-Cyanine 5 (PE)Cy5 (UCHT1), anti-CD28-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (CD28.2), anti-CD27-FITC (M-T271), anti-CD45RA-FITC (HI100), anti-CD45RO-FITC (UCHL1), anti-CD57-FITC (NK-1), and anti-Perforin-FITC (δ G9) from Becton-Dickinson Biosciences (Le Pont-de-Claix, France). Anti-CD8 α -Allophycocyanin (APC) (B9.11), anti-CD158a,h-PE (EB6), anti-CD158b1,b2,j-PE (GL183), anti-NKG2A(CD159A)-PE (Z199), anti-CD94-PE (HP3B1) were obtained from Beckman Coulter France (Villepinte, France). Anti-CD62L-FITC (FMC46) was from Serotec (Oxford, UK).

Immunostaining and Flow Cytometry.

Freshly isolated PBMC or intrahepatic cell suspensions (0.2 to 1×10^6 cells) were immunostained by incubating with a saturating amount of appropriate labelled antibodies in phosphate buffered saline (PBS) 2%FCS/0.1% NaN₃ for 30 min in the dark on ice. Cells were washed twice and analyzed immediately. For intracellular staining, cells were first surface stained, washed and subjected to fixation/permeabilisation (Cytofix/Cytoperm kit, BD PharMingen), prior to staining for intracellular molecules according to the manufacturer instructions. Multi-parameter flow cytometric analysis was performed on a FACSCalibur instrument with the CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Nonviable cells were excluded by electronic gating using forward and side scatter measurements. Color compensation between the distinct fluorochromes was set with single fluorochrome-stained cells from the same sample. Depending on the conditions, between 20.000 and 200.000 gated events were acquired.

Statistical methods

Statistical analysis was performed using the SPSS 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). P values shown for the analysis of the frequency of NKR expressing cells between patients and controls were calculated by using the nonparametric Mann-Whitney U-test. Within-group comparisons were evaluated using the Wilcoxon signed rank's test. The Pearson test was used to study possible correlation between variables. Multivariate analysis was performed by linear regression analysis after logarithmic transformation of non Gaussian variables. All comparisons were 2-tailed. Bivariate correlations were done by computing a Spearman's correlation coefficient. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Results

Distribution of CD8⁺NK cells in cHC patients.

We first examined the proportion of circulating CD8^{dim}CD3⁻ mononuclear cells (thereafter referred to as CD8⁺NK cells) in chronic hepatitis C (cHC) patients relative to healthy individuals by using flow cytometry coupled-immunostaining. We found that the frequency of CD8⁺NK cells among blood lymphocytes was lower in patients than in healthy individuals: median value: 3.20 % (range: 0.41-10.1, n = 43) versus 5.7 % (0.9-15.8, n = 29) respectively ($p = 0.0014$). As to liver infiltrating lymphocytes from patients, the frequency of CD8⁺NK cells was lower than that observed in peripheral blood lymphocytes (PBL) when paired samples were available (not shown). Circulating CD8⁺NK cells were then examined for expression of distinct surface molecules including the replicative senescence marker CD57 (Brenchley, Karandikar et al. 2003), CD62L that can affect the migratory properties of NK cells (Frey, Packianathan et al. 1998), CD27 whose engagement can modulate NK cell activity (Sugita, Robertson et al. 1992; Yang, Agematsu et al. 1996) and CD45RO whose expression can be upregulated on activated NK cells during acute infection) (Lima, Almeida et al. 2002). Overall, there was no substantial phenotypic distinction between circulating CD8⁺NK cells from patients and controls in term of frequency of positive cells. (Table II). If anything, the mean fluorescence intensity of CD57 on CD8⁺NK cells from patients was increased relative to controls (not shown) suggesting that such cells might display a limited proliferation capacity. As to the cytotoxicity potential, there was a comparable proportion of CD8⁺NK cells with perforin expression in patients and controls as assessed by intracellular staining: 85 % (69-95) versus 82 % (77-90) for controls (n = 7) and patients (n = 6) respectively. The results indicate thus a reduction of the CD8⁺NK cell pool during chronic hepatitis C.

The frequency of liver infiltrating CD8⁺NK cells positively associates with serum ALAT level.

We next searched for possible relationship between the frequency of CD8⁺NK cells and clinical parameters of the disease including viremia, alanine aminotransferase (ALAT) level, liver necroinflammation and fibrosis. While we observed no significant association for the circulating CD8⁺NK cell pool, the analysis of intrahepatic CD8⁺NK cells revealed a significant positive correlation between the frequency of CD8⁺NK cells that infiltrate the liver and the level of ALAT in the serum ($r = 0.661$; $p = 0.0105$) (**Table III**).

Expression of HLA class I specific receptors by CD8⁺NK cells in cHC patients.

Because the functional properties of NK lymphocytes are modulated by the engagement of multiple surface receptors including receptors reacting to classical and non classical HLA class I molecules (Moretta, Biassoni et al. 2002; Moretta, Biassoni et al. 2002; Moretta, Bottino et al. 2002; Lanier 2005), we analysed CD8⁺NK cells from patients for expression of such NK receptors (NKR). We thus examined expression of the C-type lectin NKG2A/CD159A receptor (along with its companion chain CD94), as well as of CD158a/h and CD158b/j that belong to the killer cell immunoglobulin (Ig)-like receptors (KIRs) family. We observed no significant differences in the frequency of cells expressing CD158a/h, CD158b/j, NKG2A or CD94 among blood CD8⁺NK from patients and controls (**Table IV**). Within the diseased liver, the proportion of CD8⁺NK cell expressing CD158a/h was clearly low relative to blood (11 % versus 18 %, $p = 0.012$) while the frequency of other subsets remained comparable.

Subsets of CD8⁺NK cells defined by HLA class I specific NKR expression were phenotypically quite comparable between blood cells of patients and healthy individuals

(Table V). Among markers that were analyzed, only the frequency of cells with high surface expression of CD45RA (CD45RA^{hi}) significantly differed between the two cohorts. Namely a slight reduction was detectable in patient samples; 99 % (97-100) versus 91 % (83-98) ($p = 0.021$) for KIRs⁺CD8⁺NK cells from controls and patients respectively and 95 % (91-97) versus 90 % (66-95) ($p = 0.033$) for NKG2A⁺CD8⁺NK cells. This trend did not quite translate into a converse pattern of CD45RO expression since although there was an increase in the frequency of CD45RO⁺ cells among NKG2A⁺CD8⁺NK cells (3 % (1-7) versus 8 % (3-40)), it failed to reach statistical significance ($p = 0.06$). With respect to cytolytic potential, there was no differences in the percentage of CD8⁺NK cells positive for perforin expression between patients and controls upon distinction by either NKG2A or KIRs molecule expression (Table V).

Positive relationship between the frequency of intrahepatic CD8⁺NK cells expressing CD158b,j KIRs and multiple clinical parameters.

We next examined the distribution of subsets of CD8⁺NK cells with distinct HLA class I specific NKR expression as a function of clinical parameters. The major observation was that the frequency of intrahepatic CD8⁺NK cells expressing CD158b,j was positively correlated with both of the histological parameters (activity and fibrosis scores) as well as with the serum level of ALAT (Table VI). Within the blood cell compartment, the frequency of the same CD8⁺NK cell subset only correlated with the Metavir Fibrosis score but at a clearly lower level. Interestingly however, such a correlation was negative ($r = - 0.38$). As to viremia, no significant correlation was observed in the analysis.

Analysis of CD8⁺NK cells stratified according to CD56 expression status.

Like NK cells considered at large, CD8⁺NK cells comprise both CD56^{dim} and CD56^{bright} subpopulations (Jonges, Albertsson et al. 2001; Lima, Teixeira et al. 2001; Perez, Mitchell et al. 2004). CD56^{dim} and CD56^{bright} subsets are in fact known to differ both by phenotypic and functional aspects (Cooper, Fehniger et al. 2001). We therefore examined the respective abundance of both subpopulations among CD8⁺NK cells during cHC. Within the circulating CD8⁺NK cell pool, the fraction of CD56^{dim} cells was slightly but significantly reduced in patients relative to controls: 83 % (20-98), (n = 27) versus 91 % (60-96), (n = 16) respectively ($p = 0.0431$). Conversely, the proportion of CD56^{bright} cells was increased: 8 % (0.8-70), (n = 27) versus 4 % (1-18), (n = 27) ($p = 0.0164$). In both the patient and control groups, the frequency of CD8⁺NK cells that lacked CD56 expression did not significantly vary (6.2 % (0.6-23) versus 4.3 % (2-29) respectively). In patients, when comparing paired CD8⁺NK cell samples from blood and liver, we observed no significant differences for either CD56^{bright} cells (8 % (0.8-70) versus 4.1 % (0.9-10.6), $p = 0.075$) or CD56^{dim} cells (83 % (20-98) versus 78.5 % (39-89), $p = 0.10$) (n = 11). Thus, the data indicate that The CD56^{dim/bright} ratio is modified within the circulating CD8⁺NK cells pool during persistent HCV infection.

The frequency of CD56^{dim} CD8⁺NK cells positively correlates with the fibrosis index in the diseased liver of cHC patients.

As to the analysis of correlation between the frequency of either CD56^{dim} cells or CD56^{bright} cells among CD8⁺NK cells and clinical parameters, we observed a single significant association, namely a marked positive correlation between the frequency of CD56^{dim} cells among liver infiltrating CD8⁺NK cells and the Metavir fibrosis score ($r = 0.68$, $p = 0.031$) (Table VII). Of interest is the fact that HLA Class I specific receptors are differentially expressed among NK cell subsets delineated by CD56 surface expression level; while

CD56^{dim} NK cells are killer cells relatively enriched in KIRs expressing cells, they still comprise a sizable pool of NKG2A⁺ cells. In contrast, CD56^{bright} NK cells are cytokine producers that are virtually all NKG2A⁺ and, with the exception of KIR2DL4, do not express most KIRs (Cooper, Fehniger et al. 2001). Indeed, we observed that, at least for circulating cells, such differential NKRs expressions were quite preserved within the CD8⁺NK cell pool under conditions of chronic HCV infection; CD56^{dim} cells from patients comprised important fractions of both KIRs⁺ and NKG2A⁺ cells whereas CD56^{bright} cells were essentially NKG2A⁺ (**Table VIII**). Thus, the positive association between the fraction of CD56^{dim} (i.e. KIRs⁺ enriched) cells among liver CD8⁺NK cells and the fibrosis score is somehow consistent with the results presented above where CD158b_j⁺ cell frequency among CD8⁺NK cells was positively associated with histological parameters. At a lower level of association (r = 0.4 to 0.5), the proportion of the CD56^{bright} subset of blood CD8⁺NK cells negatively correlated with ALAT level and the frequency of their CD56^{dim} counterparts was positively associated with ALAT level (**Table VII**).

Discussion

We report here on the main characteristics of the CD8 positive subset of NK lymphocytes in patients with characterized chronic hepatitis C. We observed significant alteration in the frequency and composition of blood CD8⁺NK cells in patients. Also of interest was the fact that particular fractions of CD8⁺NK cells that infiltrate the inflamed liver show positive relationship with major clinical parameters of the disease.

Overall, the phenotype of CD8⁺NK cells in general as well as upon stratification according to HLA class I specific NKR expression was quite comparable between blood cells from patients and from healthy individuals. In contrast, the frequency of CD8⁺NK cells among blood lymphocytes was lower in patients than in controls. This trend is indeed compatible with data from the analysis of the total NK cell pool of cHC patients (data not shown). A possible alteration of the proportion of circulating CD3⁻CD8^{dim} cells in HCV persistent infection has been evoked (Par, Rukavina et al. 2002). However, in such a study, nearly 40 % of the patients analyzed were under IFN- α treatment making it difficult to know whether the observed alteration was a consistent feature of chronic infection or whether the CD8⁺NK cell frequency was in fact modulated directly or indirectly by the IFN- α treatment itself. Because the patients involved in the present study were not under therapy at the time biopsies were collected, our observation establishes that the reduced frequency of CD8⁺NK cells is indeed a parameter associated with chronic HCV infection. We found no significant differences in the frequency of cells expressing CD158a/h, CD158b/j or NKG2A HLA class I specific receptors among blood CD8⁺NK from patients and controls. We therefore conclude that subsets defined by expression of such receptors are equally sensitive to the altered frequency that affects the CD8⁺NK cell pool at large during cHC.

The analysis of the frequency of liver infiltrating CD8⁺NK cells revealed a marked positive association with the serum level of ALAT. The same relationship was also found for

the fraction of intrahepatic CD8⁺NK cells that are positive for CD158b,j receptors expression. In addition, the frequency of intrahepatic CD8⁺NK cells expressing CD158b,j was positively correlated with both the fibrosis score and the necroinflammation score. Interestingly, in the blood, the frequency of the same subset correlated negatively with the fibrosis score, albeit at a lower level, possibly reflecting a depletion phenomenon. These results could suggest that liver infiltrating CD8⁺NK cells are involved at a certain level in the development of liver lesions as well as in the fibrogenesis that is commonly associated with such damage. The fact that CD8⁺NK cells are characterized by a strong cytotoxicity potential (Srour, Leemhuis et al. 1990; Fuchshuber and Lotzova 1992; Addison, North et al. 2005) able to operate efficiently in vivo (Lowdell, Ray et al. 1997; Lowdell, Craston et al. 2002) is relatively compatible with such a possibility. The reasons for which the frequency of the liver CD158b,j⁺ CD8⁺NK cell subset was positively associated with both ALAT level and histological parameters are unclear. However, one has to keep in mind that CD158b,j⁺ cells are cells capable of expressing the activating KIR2DS2 receptor as well as the KIR2DL2 and/or KIR2DL3 inhibitory receptors (Parham 2005). Given that the interaction of KIR2DL2/KIR2DL3 receptors with their HLA-C ligand is characterized by a lower affinity than that of other inhibitory KIRs such as KIR2DL1 (Winter, Gumperz et al. 1998), it is possible that CD158b,j⁺CD8⁺NK cells represent cells that receive milder inhibitory signals than CD158a,h⁺CD8⁺NK cells and therefore that liver CD158b,j⁺CD8⁺NK cells could cause more tissue damage than other NK cell subset that receive substantially stronger inhibitory signals. In line with such a reasoning it was proposed that a relatively weak inhibition of NK cell activity might account for the observation that under some circumstances, individuals that are homozygous for KIR2DL3 and its HLA-C ligand resolve HCV infection with a greater frequency than patients with other genotypes (Khakoo, Thio et al. 2004).

However, if subsets of CD8⁺NK cells substantially contribute to the development of liver lesions, one has to consider that such cells might be relatively less sensitive to various factors that are likely to limit NK cell activity in cHC. For instance, although no definitive consensus has been reached, there are studies suggesting some form of alteration of NK cell cytolytic activity in cHC patients (Corado, Toro et al. 1997; Lirussi, Beccarello et al. 2002; Lin, Gonzalez et al. 2004; Meier, Owen et al. 2005). In addition, the HCV E2 protein has the potential to negatively regulate the activation and proliferation of NK cells (Pileri, Uematsu et al. 1998; Crotta, Stilla et al. 2002; Tseng and Klimpel 2002) and an elevated expression level of HLA-E on multiple liver cell types is promoted by HCV leading to NK cell inhibition via interaction with NKG2A inhibitory receptor (Nattermann, Feldmann et al. 2005). Whether CD8⁺NK cells are less sensitive to such inhibitory effects than their CD8⁻ counterparts is unknown. On the other hand, it remains possible that within the inflamed liver, particular CD8⁺NK cell subsets survive better than other NK cells. For instance, it has been found that the engagement of CD158b,j protects CD8⁺NK cells from apoptosis that is induced upon interaction of CD8 α with soluble HLA class I molecules (Spaggiari, Contini et al. 2002).

Within circulating CD8⁺NK cells, the fraction of CD56^{dim} cells was lowered in patients relative to controls while the proportion of CD56^{bright} cells was increased. Such a shift in the CD56^{dim/bright} ratio is reminiscent of the alterations observed for the NK cell compartment considered at large in cHC patients (Morishima C 2006, Lin A 2004, Meier U 2005 and our own unpublished observations). In patients and controls, the frequency of CD8⁺NK cells that were negative for CD56 expression was unchanged indicating that, unlike NK cells from patients with chronic HIV infection (Eger and Unutmaz 2004; Mavilio, Lombardo et al. 2005), CD56⁻CD8⁺NK cells do not show sign of expansion in chronic hepatitis C. As to liver infiltrating cells, the frequency of CD56^{dim}CD8⁺NK cells positively correlated with the fibrosis index. Unlike CD56^{bright} cells that are essentially NKG2A⁺,

CD56^{dim} cells comprise an important fraction of KIRs⁺ cells. Hence, the positive association between the fraction of CD56^{dim} (that is, relatively enriched in KIRs⁺ cell) cells among liver CD8⁺NK cells and the fibrosis score is somehow consistent with the observation that CD158b,j⁺ cell frequency among liver CD8⁺NK cells was positively correlated with histological parameters. Finally, because they contain less NKG2A⁺ cells, CD56^{dim} cells are most certainly less susceptible than CD56^{bright} cells to inhibition by HCV-induced high expression level of HLA-E molecules that characterizes the liver microenvironment during cHC (Nattermann, Feldmann et al. 2005).

In conclusion, CD8⁺NK cells present alteration in their distribution during chronic hepatitis C and particular fractions of this NK cell subset display striking relationship with major clinical parameters. A greater level of analysis of CD8⁺NK cells in HCV-infected patients in general might therefore be helpful in the understanding of innate immune response during disease progression.

Acknowledgements

We thank all patients who enrolled in this study for their cooperation. We are grateful to the Etablissement Français du Sang (EFS) Rhône-Alpes Grenoble (La Tronche, France) for providing us with blood samples from healthy donors. We also thank M. Faure and C. Viret for comments and discussions.

Footnotes:

This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and a specific grant from the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida et les Hépatites virales (ANRS). P.B. was supported by fellowships from the french government and from the ANRS.

Corresponding author: Dr. E. Jouvin-Marche, CEA DRDC and INSERM U548, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble cedex 9 (France) ; Tel: (33) 4 38 78 38 73; Fax: (33) 4 38 78 98 03; E mail: immuno@dsvsud.cea.fr

Table I: Demographic and clinical characteristics of chronically HCV-infected patients included in this study (n = 43)

<i>Sex:</i>		
Female	14/43	33 %
<i>Age (years)*</i>		
	48 (30-75)	
<i>Duration of infection (years)*</i>		
	21 (2-51)	
<i>Source of infection :</i>		
Intravenous drug abuse	23/43	53 %
Transfusion	10/43	23 %
Other modes	5/43	12 %
Unknown	5/43	12 %
<i>Plasma Viral load (log IU/ml) *</i>		
	6.09 (4.47-6.95)	
<i>Viral genotype:</i>		
1	25/43	58 %
2	6/43	14 %
3	7/43	16 %
4	4/43	9 %
ND	1/43	2 %
<i>Serum ALT (IU/ml)*</i>		
	52 (22-253)	
<i>Liver Histology</i>		
<i>Metavir activity score:</i>		
1	20/43	47 %
2	14/43	33 %
3	7/43	16 %
ND	2/43	5 %
<i>Metavir fibrosis score:</i>		
0	4/43	9 %
1	19/43	44 %
2	11/43	26 %
3	3/43	7 %
4	6/43	14 %

Note that for technical reasons (number of cells available per sample), all the experiments described could not be performed for every single patients. * Median (range).

ND: not determined. IU/ml : international units par mililiter. ALT: Alanine aminotransferase.

Table II: Phenotypic characteristics of circulating CD8⁺NK cells from patients with chronic hepatitis C.

	CD45RA ^{total}	CD45RA ^{high*}	CD45RO**	CD27	CD28	CD62L	CD57
Patients	97 % (92 - 99)	91% (74 – 95)	3% (1.4 - 31)	7 % (6 - 34)	0.47% (0.06-7)	39 % (9,2 – 61,5)	39 % (32 - 60)
n =	12	10	7	5	10	9	5
Controls	99 % (96 - 99)	97% (92 - 98)	1 % (0.7- 1.8)	12 % (5.5 - 17)	0.50 % (0.2-1)	39 % (12 – 66,5)	50 % (26 - 53)
n =	6	7	5	4	6	6	5

The values represent the median percentage of circulating CD8⁺NK cells surface expressing a particular marker. Extreme values are indicated. *p = 0.0021 **p = 0.0095

Table III: Correlations between the frequency of CD8+ NK cells and clinical parameters in chronically HCV-infected patients.

	Met. Activity	Met. Fibrosis	Viremia	ALAT
IHLs	r = 0.131	0.271	0.016	0.661
	p = 0.612	0.294	0.954	0.001**
n =	16	16	13	16
Blood	r = 0.08	0.063	- 0.001	0.058
	p = 0.61	0.682	0.993	0.722
n =	41	43	34	39

IHLs: intrahepatic lymphocytes. r : correlation coefficient.** : p value less than 0.01.

Table IV : Expression of HLA Class I specific receptors by CD8⁺NK cells from patients chronically infected with HCV.

	CD158a,h	CD158b,j	NKG2A	CD94
Blood cells patients	18 % (5-38)	27 % (7-50)	51 % (15-83)	85 % (50-99)
n =	27	27	40	25
Controls	27 % (14 -71)	31 % (12-49)	50 % (23-75)	81 % (16-94)
n =	16	16	27	16
iHLs patients	11 % (0.6-27)	26% (19-40)	42 % (17-63)	87 % (22-99)
n =	11	11	13	10

The values represent the median percentage of CD8⁺NK cells expressing NK receptors for either blood cells or liver infiltrating mononuclear cells. Lower and higher values are indicated.

Table V : Phenotypic features of subsets of circulating CD8⁺NK cells distinguished by HLA Class I specific NKRs expression from cHC patients and controls.

	Controls		Patients	
	KIRs ⁺	NKG2A ⁺	KIRs ⁺	NKG2A ⁺
CD45RA n =	99 (99-100) 4	99 (96-99) 5	96 (88-100) 5	97 (88-99) 10
CD45RA^{hi} n =	99 (97-100) 4	95 (91-97) 5	91 (83-98) p: 0,021* 5	90 (66-95) p: 0,033* 8
CD45RO n =	0.4 (0.1-0.6) 4	3 (1-7) 5	0.2 (0.8-0.16) 3	8 (3-40) 7
CD57 n =	62 (45-54) 4	28 (26-46) 5	58 (49-87) 5	26 (11-39) 6
CD27 n =	4 (1.9-4.7) 4	18 (9-26) 4	4 (1.3-15) 5	10 (6-27) 4
CD28 n =	0.02 (0-0.3) 4	0.4 (0.18-2) 5	0.2 (0-0.7) 8	0.2 (0.1-1.1) 7
CD62L n =	20 (1.8-68) 5	58 (43-83) 5	36 (1-47) 5	61 (52-88) 4
CD62L^{hi} n =	6 (0.5-43) 5	43 (23-67) 5	15 (0.3-17) 5	23 (3.7-74) 4
Perforin n =	97 (88-99) 7	79 (54-94) 6	94 (89-98) 6	84 (70-85) 5

Values represent the median percentage and range of positive blood CD8⁺NK cells for surface expression of a given marker after electronic gating on KIRs⁺ or NKG2A⁺ cells. * : *p* value less than 0.05.

Table VI: Correlations between the frequency of CD8⁺NK cells expressing HLA class I specific NKR clinical parameters in chronically HCV-infected patients.

	% CD158a/h+	% CD158b/j+	% NKG2A+	% CD94+
IHLs				
Activity	r = - 0.049	0.625	0.07	0.609
	p = 0.87	0.048*	0.816	0.06
n =	12	11	13	10
Fibrosis	r = - 0.32	0.686	0.535	- 0.176
	p = 0.288	0.03*	0.076	0.598
n =	12	11	13	10
ALAT	r = - 0.14	0.682	0.371	0.009
	p = 0.963	0.031*	0.219	0.978
n =	12	11	13	10
Viremia	r = 0.248	- 0.183	- 0.261	0.429
	p = 0.456	0.604	0.434	0.224
n =	10	9	11	9
Blood				
Activity	r = - 0.259	- 0.261	- 0.005	0.114
	p = 0.195	0.192	0.975	0.584
n =	26	26	38	24
Fibrosis	r = - 0.163	- 0.386	0.132	- 0.007
	p = 0.407	0.049*	0.410	0.972
n =	27	27	40	25
ALAT	r = - 0.078	- 0.113	- 0.231	0.124
	p = 0.707	0.587	0.171	0.570
n =	24	24	36	22
Viremia	r = - 0.026	0.163	- 0.181	- 0.112
	p = 0.901	0.444	0.313	0.607
n =	23	23	32	22

IHLs: intrahepatic lymphocytes. r : correlation coefficient. * : p values less than 0.05.

Table VII : Correlations between the frequency of CD56^{bright} and CD56^{dim} CD8⁺NK cells and clinical parameters in chronically HCV-infected patients.

	Met. Activity	Met. Fibrosis	Viremia	ALAT
CD56^{dim}				
IHLs	r = 0.345	0.68	- 0.43	0.564
	p = 0.274	0.031*	0.196	0.07
n =	11	11	10	11
Blood	r = 0.252	- 0.028	0.110	0.414
	p = 0.207	0.88	0.606	0.046*
n =	26	27	23	24
CD56^{bright}				
IHLs	r = - 0.157	0.491	- 0.118	- 0.161
	p = 0.62	0.12	0.722	0.609
n =	11	11	10	11
Blood	r = 0.017	0.249	- 0.197	- 0.523
	p = 0.93	0.203	0.35	0.012*
n =	26	27	23	24

IHLs: intrahepatic lymphocytes. r : correlation coefficient.* : p values less than 0.05.

Table VIII: Distribution of KIR⁺ and NKG2A⁺ cells among circulating CD56^{bright} and CD56^{dim} CD8⁺NK cells from healthy individuals and HCV-infected patients.

	Among CD8 ⁺ CD3 [°] CD56 ^{dim}	
	Controls	Patients
CD158a,h n =	29.6 (8.4-72.1) 18	24.9 (7.9-45.1) 23
CD158b,j n =	35.7 (14-77.7) 16	35.7 (10-55.7) 23
NKG2A n =	46.6 (19.7-68.8) 17	49 (13.8-81.9) 23
	Among CD8 ⁺ CD3 [°] CD56 ^{bright}	
	Controls	Patients
CD158a,h n =	6.2 (1.4-17.1) 18	6.6 (1.1-21.7) 23
CD158b,j n =	7.1 (1.5-15) 16	7.6 (2.1-27.9) 23
NKG2A n =	91.4 (81.3-99.3) 17	91.8 (75.8-99.5) 23

Blood CD8⁺NK cells were analyzed for HLA class I specific receptor expression after electronic gating on either CD56^{dim} or CD56^{bright} cells. Values represent median percentage and range.

References

- Addison, E. G., J. North, et al. (2005). "Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity." *Immunology* **116**(3): 354-61.
- Bowen, D. G. and C. M. Walker (2005). "Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection." *Nature* **436**(7053): 946-52.
- Brenchley, J. M., N. J. Karandikar, et al. (2003). "Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells." *Blood* **101**(7): 2711-20.
- Chisari, F. V. (2005). "Unscrambling hepatitis C virus-host interactions." *Nature* **436**(7053): 930-2.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* **22**(11): 633-40.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." *Blood* **97**(10): 3146-51.
- Corado, J., F. Toro, et al. (1997). "Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection." *Clin Exp Immunol* **109**(3): 451-7.
- Crotta, S., A. Stilla, et al. (2002). "Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein." *J Exp Med* **195**(1): 35-41.
- Deignan, T., M. P. Curry, et al. (2002). "Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection." *J Hepatol* **37**(1): 101-8.
- Duesberg, U., A. M. Schneiders, et al. (2001). "Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C." *J Hepatol* **35**(5): 650-7.
- Eger, K. A. and D. Unutmaz (2004). "Perturbation of natural killer cell function and receptors during HIV infection." *Trends Microbiol* **12**(7): 301-3.
- Frey, M., N. B. Packianathan, et al. (1998). "Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets." *J Immunol* **161**(1): 400-8.
- Fuchshuber, P. R. and E. Lotzova (1992). "Differential oncolytic effect of NK-enriched subsets in long-term interleukin-2 cultures." *Lymphokine Cytokine Res* **11**(5): 271-6.
- Griffin, J. D., T. Hercend, et al. (1983). "Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells." *J Immunol* **130**(6): 2947-51.
- Jonges, L. E., P. Albertsson, et al. (2001). "The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood." *Scand J Immunol* **53**(2): 103-10.
- Khakoo, S. I., C. L. Thio, et al. (2004). "HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection." *Science* **305**(5685): 872-4.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." *Annu Rev Immunol* **23**: 225-74.
- Lanier, L. L., A. M. Le, et al. (1983). "Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens." *J Immunol* **131**(4): 1789-96.
- Lima, M., J. Almeida, et al. (2002). "The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states." *Blood Cells Mol Dis* **28**(2): 181-90.

- Lima, M., M. A. Teixeira, et al. (2001). "Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties." *Blood Cells Mol Dis* **27**(4): 731-43.
- Lin, A. W., S. A. Gonzalez, et al. (2004). "CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection." *Clin Exp Immunol* **137**(2): 408-16.
- Lirussi, F., A. Beccarello, et al. (2002). "Impaired Natural Killer cell cytotoxic activity in chronic hepatitis C viral infection: a single center, controlled study." *Current Therapeutic Research* **63**(11): 748-58.
- Lodoen, M. B. and L. L. Lanier (2005). "Viral modulation of NK cell immunity." *Nat Rev Microbiol* **3**(1): 59-69.
- Lowdell, M. W., R. Craston, et al. (2002). "Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells." *Br J Haematol* **117**(4): 821-7.
- Lowdell, M. W., N. Ray, et al. (1997). "The in vitro detection of anti-leukaemia-specific cytotoxicity after autologous bone marrow transplantation for acute leukaemia." *Bone Marrow Transplant* **19**(9): 891-7.
- Mavilio, D., G. Lombardo, et al. (2005). "Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2886-91.
- Meier, U. C., R. E. Owen, et al. (2005). "Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections." *J Virol* **79**(19): 12365-74.
- Moebius, U., G. Kober, et al. (1991). "Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations." *Eur J Immunol* **21**(8): 1793-800.
- Moretta, L., R. Biassoni, et al. (2002). "Human NK cells and their receptors." *Microbes Infect* **4**(15): 1539-44.
- Moretta, L., R. Biassoni, et al. (2002). "Surface receptors that regulate the NK cell function: beyond the NK cell scope." *Curr Top Microbiol Immunol* **266**: 11-22.
- Moretta, L., C. Bottino, et al. (2002). "Human natural killer cells: their origin, receptors and function." *Eur J Immunol* **32**(5): 1205-11.
- Morishima, C., D. M. Paschal, et al. (2006). "Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing." *Hepatology* **43**(3): 573-80.
- Nattermann, J., G. Feldmann, et al. (2005). "Surface expression and cytolytic function of NK cell receptors is altered in chronic hepatitis C." *Gut*.
- Orange, J. S. (2002). "Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection." *Microbes Infect* **4**(15): 1545-58.
- Orange, J. S., M. S. Fassett, et al. (2002). "Viral evasion of natural killer cells." *Nat Immunol* **3**(11): 1006-12.
- Ortaldo, J. R., S. O. Sharrow, et al. (1981). "Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies." *J Immunol* **127**(6): 2401-9.
- Par, G., D. Rukavina, et al. (2002). "Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection." *J Hepatol* **37**(4): 514-22.
- Parham, P. (2005). "MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival." *Nat Rev Immunol* **5**(3): 201-14.
- Parnes, J. R. (1989). "Molecular biology and function of CD4 and CD8." *Adv Immunol* **44**: 265-311.

- Pawlotsky, J. M. (2004). "Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease." Trends Microbiol **12**(2): 96-102.
- Perez, O. D., D. Mitchell, et al. (2004). "LFA-1 signaling through p44/42 is coupled to perforin degranulation in CD56+CD8+ natural killer cells." Blood **104**(4): 1083-93.
- Perussia, B., V. Fanning, et al. (1983). "A human NK and K cell subset shares with cytotoxic T cells expression of the antigen recognized by antibody OKT8." J Immunol **131**(1): 223-31.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science **282**(5390): 938-41.
- Racanelli, V. and B. Rehermann (2003). "Hepatitis C virus infection: when silence is deception." Trends Immunol **24**(8): 456-64.
- Robertson, M. J. and J. Ritz (1990). "Biology and clinical relevance of human natural killer cells." Blood **76**(12): 2421-38.
- Shoukry, N. H., A. G. Cawthon, et al. (2004). "Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection." Annu Rev Microbiol **58**: 391-424.
- Spaggiari, G. M., P. Contini, et al. (2002). "Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor superfamily." Blood **99**(5): 1706-14.
- Srour, E. F., T. Leemhuis, et al. (1990). "Cytolytic activity of human natural killer cell subpopulations isolated by four-color immunofluorescence flow cytometric cell sorting." Cytometry **11**(3): 442-6.
- Sugita, K., M. J. Robertson, et al. (1992). "Participation of the CD27 antigen in the regulation of IL-2-activated human natural killer cells." J Immunol **149**(4): 1199-203.
- Tseng, C. T. and G. R. Klimpel (2002). "Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions." J Exp Med **195**(1): 43-9.
- Winter, C. C., J. E. Gumperz, et al. (1998). "Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition." J Immunol **161**(2): 571-7.
- Yang, F. C., K. Agematsu, et al. (1996). "CD27/CD70 interaction directly induces natural killer cell killing activity." Immunology **88**(2): 289-93.

Etude du répertoire des récepteurs KIR de patients atteints
d'Hépatite virale C chronique.

Etude du répertoire des récepteurs KIR de patients atteints d'Hépatite virale C chronique.

Introduction

Etant donné la diversité des séquences (polymorphisme allélique) et des haplotypes (polymorphisme polygénique) des KIR et leur rôle dans la régulation de la réponse immunitaire, il est très probable qu'ils influencent la résistance aux pathologies et en particulier aux maladies infectieuses. Bien que leur interprétation ne soit pas aisée, la mise en évidence d'une association entre la susceptibilité à une maladie et la distribution de récepteurs KIR particuliers pourrait donc aider à comprendre sa pathogenèse. Beaucoup d'études sont donc réalisées dans des domaines divers tels que l'autoimmunité, les maladies infectieuses, les cancers, la biologie de la reproduction, et la transplantation (voir pour revue : Parham, 2005 ; Bashirova et al., 2006). Dans certaines pathologies autoimmunes, la fréquence de KIR2DS1 et KIR2DS2, ainsi que la proportion des haplotypes enrichis en KIR activateurs (haplotypes B), sont plus élevées chez les patients que chez les individus sains. Ainsi, la présence de KIR2DS1 semble associé à une susceptibilité accrue vis à vis du psoriasis chez les individus HLA Cw*06 (Luszczek et al., 2004). Par ailleurs, dans le cas de l'infection par le VIH, la présence de KIR3DS1 et de ligands du type HLA-Bw4 (qui contient une Isoleucine dans la position 80) est associée avec une progression plus lente vers le SIDA (Martin et al., 2002).

L'objectif de cette étude était de rechercher un biais éventuel dans le répertoire des récepteurs KIR chez les patients atteints d'hépatite virale C chronique par rapport à celui d'une population d'individus contrôles. Peu après le début de ce projet, une étude portant sur un très grand nombre de patients a été publiée (Khakoo et al., 2004). Cette étude indique que chez les individus infectés par des faibles doses de VHC (par exemple par seringues contaminées) et qui sont homozygotes pour KIR2DL3 et des ligands HLA C1, la probabilité de résoudre l'infection est plus élevée que parmi le reste des patients. Eventuellement, le fait que l'interaction KIR2DL3-HLA C1 semble de faible affinité par rapport à d'autres interactions (comme KIR2DL1-HLA C2) pourrait contribuer à une moindre inhibition de la réponse effectrice des cellules exprimant KIR2DL3.

Je présente ci après les résultats actuels obtenus sur une vingtaine de patients atteints d'Hépatite virale C chronique. A cause de ce nombre relativement limité, il est difficile de présenter des conclusions définitives et un nombre plus important d'échantillons est nécessaire. Néanmoins, les résultats suggèrent de possibles associations.

Présentation et discussion des résultats actuels.

Augmentation de la fréquence des gènes des récepteurs KIR2DL2, KIR2DS1 et KIR3DS1 parmi les patients chroniquement infectés par le VHC.

Nous avons examiné 22 patients (Tableau I) et 19 individus contrôles par reverse transcription et PCR pour l'expression des récepteurs inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 des récepteurs activateurs KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 et KIR3DS1 et de KIR2DL4. Les résultats actuels sont présentés dans la figure 1A. Ils suggèrent une fréquence accrue des gènes du récepteur inhibiteur KIR2DL2 (CD158b1) et des récepteurs activateurs KIR2DS1 (CD158h) et KIR3DS1 (CD158e2) dans le groupe des patients par rapport au groupe des individus contrôles. Etant donné la taille limitée de nos échantillons à ce stade de l'étude, nous avons représenté dans la figure 1B, les valeurs d'une étude portant sur 268 individus sains de type caucasien (Uhrberg et al., 2002) afin de donner un élément de comparaison avec notre cohorte de 19 individus contrôles.

D'une certaine manière, l'augmentation de la fréquence du gène KIR2DL2 dans le groupe des patients est compatible avec les résultats indiquant que la probabilité de résoudre l'infection par le VHC est plus élevée chez les patients homozygotes pour KIR2DL3 et pour des ligands HLA C1 (S77-N80) (Khakoo et al., 2004). KIR2DL2 et KIR2DL3 étant des allèles d'un même locus (CD158b1,b2), si l'homozygotie pour les gènes KIR2DL3/HLA C1 réduit la susceptibilité à l'évolution vers la forme chronique, il n'est pas improbable d'observer chez les patients qui ont évolués vers la chronicité une fréquence relativement plus basse d'homozygotie pour KIR2DL3. C'est ce que semble indiquer les valeurs de la figure 2A où la fréquence des patients exprimant KIR2DL3 seulement est relativement diminuée tandis que celles des patients exprimant KIR2DL2 seulement ou KIR2DL2 et KIR2DL3 (homozygotie) sont relativement augmentées.

En ce qui concerne KIR2DS1, il représente un récepteur de faible affinité pour HLA C mais il n'est pas encore définitivement établie s'il s'agit bien de molécules du type HLA C2 (N77-K80) qui est suspecté dans certaines études. Il faut noter que HLA-Cw*04 qui est du type HLA C2 est significativement associé à la persistance du VHC chez les malades (Thio et al., 2002 ; Fanning et al., 2004). Quelque soit le(s) ligand(s), une représentation accrue du gène KIR2DS1 dans le groupe des patients pourrait peut être s'expliquer par le fait de sa faible affinité car ce type d'interaction n'est pas en faveur d'un apport important de signaux activatrices dans les cellules effectrices concernées.

Enfin, le ligand de KIR3DS1 n'étant pas connu, il n'est pas facile de proposer une explication pour rendre compte de l'augmentation de la fréquence de son gène dans le groupe des patients. On sait que KIR3DS1 et KIR3DL1 sont des allèles d'un même locus (CD158e2, e1). Un accroissement de la fréquence du gène KIR3DS1 chez les patients doit donc se traduire par une baisse relative des patients exprimant uniquement KIR3DL1. Ceci semble effectivement être le cas (Figure 3). Le fait que la fréquence du phénotype KIR3DL1/KIR3DS1 est aussi augmentée pourrait suggérer une contre sélection du phénotype KIR3DL1 unique. Le récepteur KIR3DL1 étant inhibiteur, son influence sur l'évolution vers la chronicité n'est pas aisé à analyser, du moins en terme de résonnements aussi simples que ceux proposés ci dessus. De plus, en présence d'allèles HLA-Bw4, il semble que KIR3DS1 pourrait être associé à un faible effet protecteur contre la chronicité (Khakoo et al., 2004). Il sera donc important d'obtenir l'information sur la distribution du type HLA-Bw4 parmi nos échantillons car ce type de ligands regroupe en fait les ligands de KIR3DL1. Enfin, il faut noter que chez les patients infectés par le VHC, une étude a montré que la présence de KIR3DS1 est associée à une moindre probabilité de développer un carcinome hépatocellulaire (Lopez-Vazquez et al., 2005).

Variation du nombre de récepteurs KIR exprimés chez les patients et les contrôles.

Lorsque l'on examine les deux cohortes en terme de nombre de récepteurs KIR exprimés (Figure 4), on note que la fréquence des patients qui expriment un nombre total élevé (10 et 12 gènes KIR exprimés notamment) semble plus importante parmi les patients. En ce qui concerne le nombre de KIR inhibiteurs, les patients infectés par le VHC qui expriment 6 KIR de ce type seraient plus fréquents par rapport aux contrôles. Pour les KIRs activateurs il y a 20% de la population des patients qui expriment jusqu'à 6 KIRs activateurs, tandis que chez les sujets normaux, aucun d'entre eux n'atteint ce niveau.

Phénotypes observés chez les patients et les contrôles.

Les tableaux II et III montrent que 17 phénotypes distincts ont été observés parmi les 22 patients et 16 parmi les 19 contrôles. Un cinquième des patients révèle un phénotype avec expression de tous les KIR testés. Cette situation n'a pas été détectée chez les contrôles.

Conclusions provisoires

Malgré des cohortes limitées, ces résultats suggèrent des associations possibles entre la susceptibilité à l'infection chronique par le VHC et la présence de certains récepteurs KIR. Il serait donc intéressant d'augmenter la cohorte de patients pour confirmer ces premières observations. En parallèle, il conviendra de déterminer le typage des molécules de classe I vis à vis des groupes HLA C1 et HLA C2 et également HLA-Bw4 pour aider à l'interprétation des résultats. Enfin, avec des échantillons de plus grande taille, il serait intéressant d'examiner si les déséquilibres de liaison entre certains gènes KIR qui ont été décrit pour des populations normales sont retrouvés avec des fréquences comparables ou non chez les patients.

Figure 1 : Fréquence de chaque récepteur KIR exprimé chez les patients (n = 22) et les contrôles (n = 19) **(A)** et comparaison avec les fréquences observées dans une cohorte de 268 individus sains caucasiens par Uhrberg et al., (Uhrberg et al., 2002) **(B)**.

(A)

Gène KIR	Contrôles %	Patients %	<i>p</i> [#]
KIR2DL1	79	86	0.52
KIR2DL2	68	95	0.03*
KIR2DL3	95	77	0.11
KIR3DL1	63	77	0.32
KIR3DL2	74	91	0.14
KIR2DS1	32	68	0.029*
KIR2DS2	84	68	0.23
KIR2DS3	26	32	0.69
KIR2DS4	53	77	0.09
KIR2DS5	21	36	0.28
KIR3DS1	32	73	0.012*
KIR2DL4	89	73	0.17

test exact de Fisher, * *p* < 0.05.

(B)

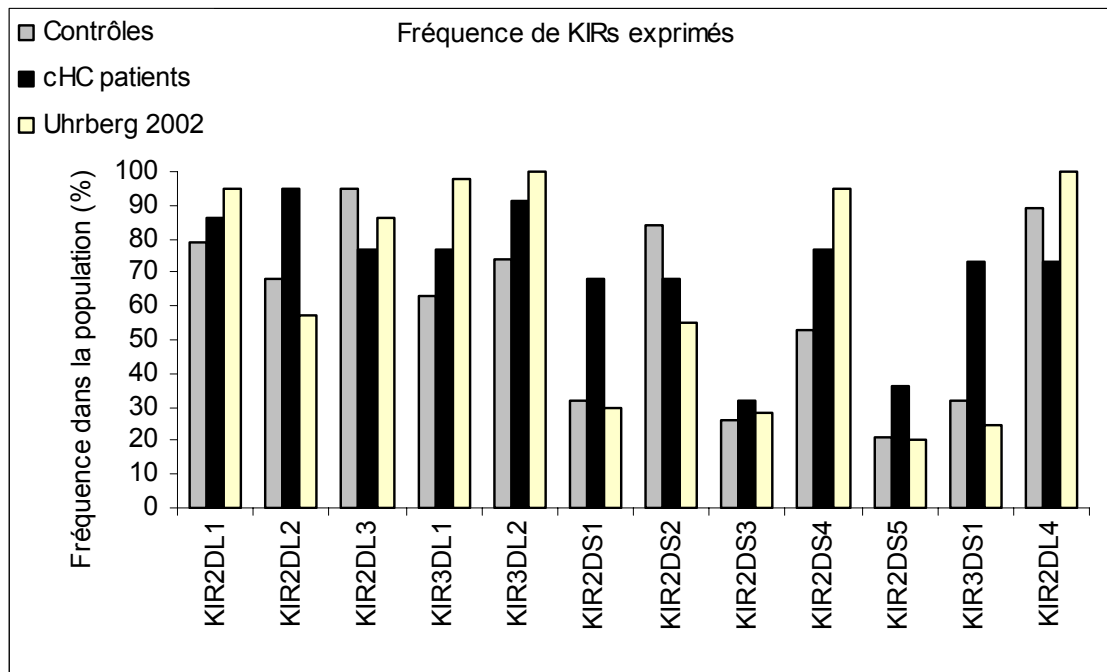


Figure 2 : Distribution des phénotypes KIR2DL2+, KIR2DL3+ et KIR2DL2/KIR2DL3 chez les patients et les contrôles. **(A)** : pourcentages. **(B)** : représentation graphique.

(A)

	% Contrôles	% Patients
KIR2DL2 seul	5	18
KIR2DL3 seul	32	0
KIR2DL2/KIR2DL3	63	77
aucun	0	4.5

(B)

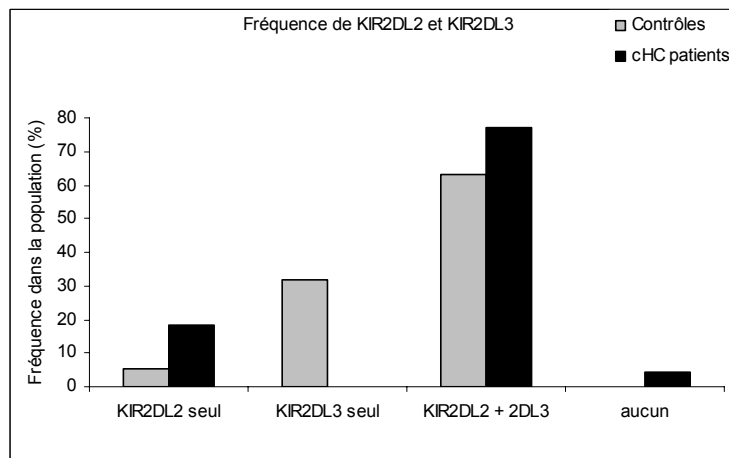


Figure 3 : Distribution des phénotypes KIR3DS1+, KIR3DL1+ et KIR3DS1/KIR3DL1 chez les patients et les contrôles. **(A)** : pourcentages. **(B)** : représentation graphique.

(A)

	% Contrôles	% Patients
KIR3DL1 seul	42	23
KIR3DS1 seul	11	18
KIR3DL1/KIR3DS1	21	55
aucun	26	5

(B)

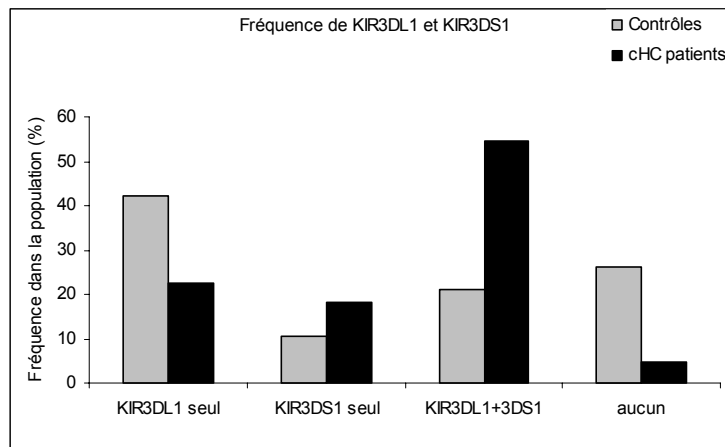


Figure 4 : Variation du nombre total de récepteurs KIR, du nombre de KIR inhibiteurs et du nombre de KIR activateurs exprimés chez les patients et les contrôles. **(A)** : pourcentages. **(B)** : représentation graphique.

(A)

Nombre total de KIRs (% contrôles, % patients)	Nombre de KIR inhibiteurs	Nombre de KIR activateurs
0	0	0 (11, 0)
1	1 (0, 5)	1 (16, 9)
2	2 (11, 9)	2 (26, 27)
3 (5, 5)	3 (11, 9)	3 (21, 14)
4 (11, 9)	4 (11, 0)	4 (16, 14)
5 (5, 0)	5 (37, 14)	5 (11, 14)
6 (5, 5)	6 (32, 64)	6 (0, 18)
7 (32,18)		
8 (21, 9)		
9 (11, 14)		
10 (0, 14)		
11 (11, 9)		
12 (0, 18)		

(B)

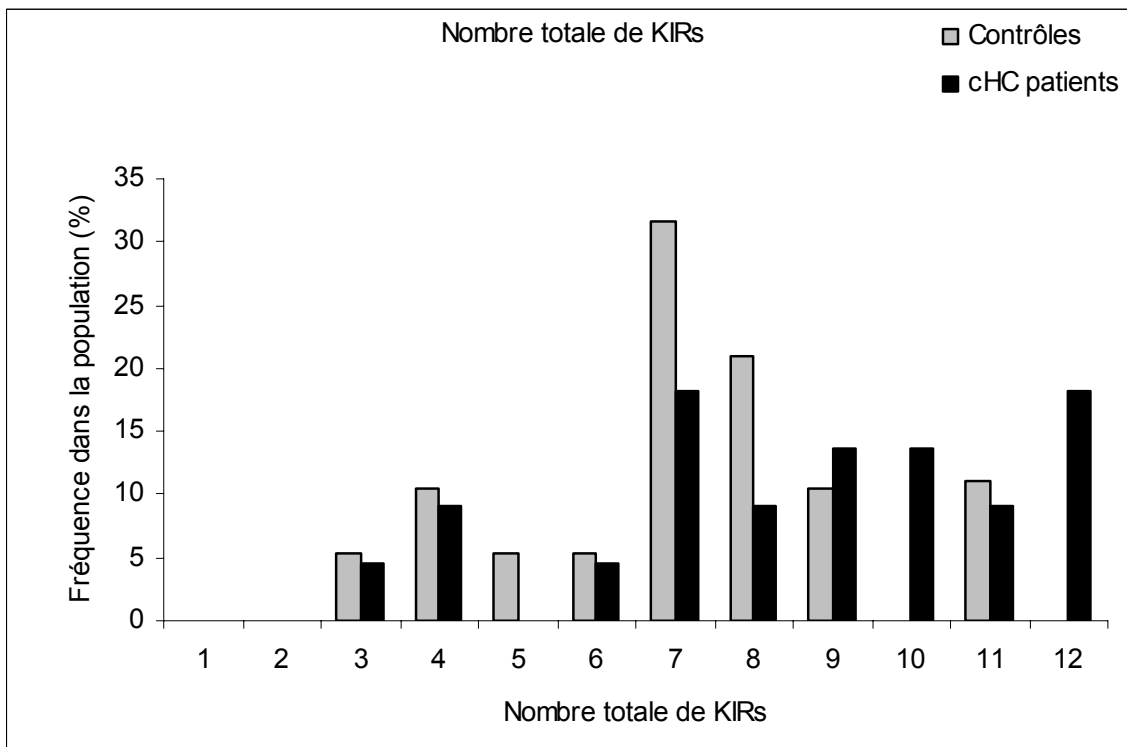


Figure 4 B cont.

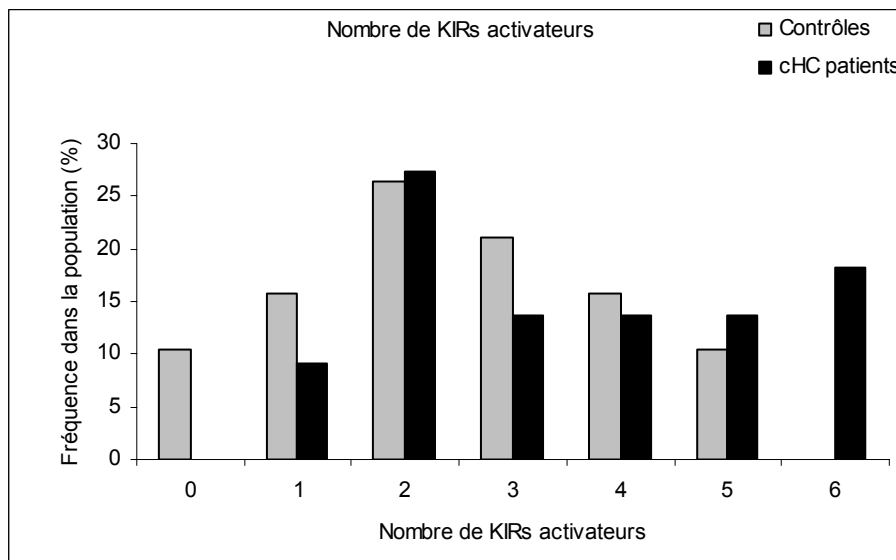
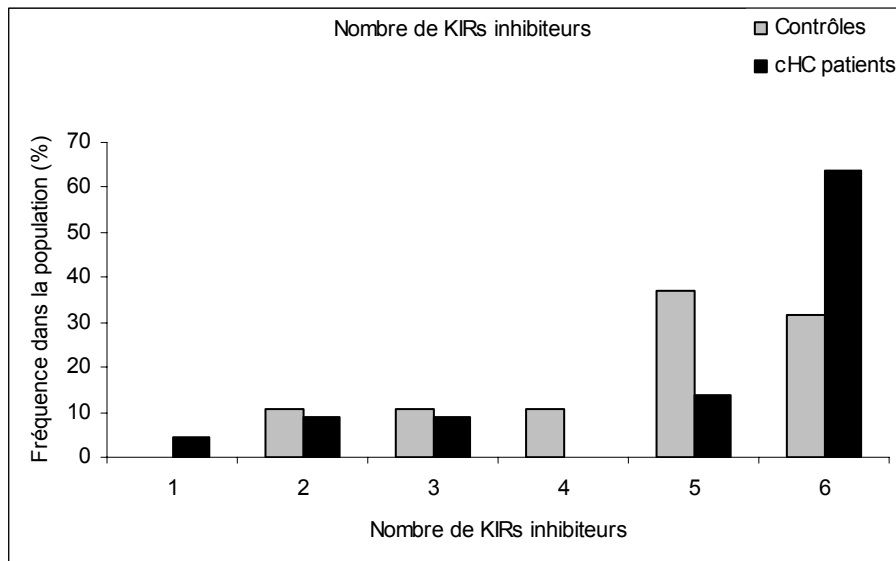


Tableau I: Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des patients impliqués dans l'analyse de répertoire des gènes KIR (n = 22).

Sexe féminin*	9/22 (41 %)
Age (années)**	51 (30 -75)
Origine de l'infection*	
Intraveineuse	11/22 (50 %)
Transfusion	6/22 (27 %)
Autres	4/22 (18 %)
Inconnu	1/22 (5 %)
Durée de l'infection (années)**	21 (6 - 51)
Charge virale plasmatique (log IU/ml) **	6 (5,47 - 6,90)
Genotype viral*	
1	12/22 (55 %)
2	3/22 (14 %)
3	5/22 (23 %)
4	1/22 (5 %)
ND	1/22 (5%)
ALT (IU/ml)**	47 (22 - 130)
<u>Histologie*</u>	
Score Metavir Activité/Inflammation	
1	10/22 (45 %)
2	8/22 (36 %)
3	4/22 (18 %)
Score Metavir Fibrose	
0	6/22 (27 %)
1	8/22 (36 %)
2	4/22 (18 %)
3	2/22 (9 %)
4	2/22 (9 %)

* Nombre/total (pourcentage %)

** Médiane (extrêmes)

ND : non déterminé

UI/ml : unité internationale/ml

ALT : alanine aminotransférase

Tableau II: Profil d'expression des KIR dans la cohorte des patients (n = 22).

Phénotype	2DL1	2DL2	2DL3	3DL1	3DL2	2DL4	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	Nombre	Fréquence
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	18.1 %
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	2	9 %
3	+	+	+	+	+	+	+			+		+	2	9 %
4	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	1	4.5 %
5					+	+	+					+	1	4.5 %
6		+					+					+	1	4.5 %
7	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	1	4.5 %
8	+	+	+	+	+					+			1	4.5 %
9	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	1	4.5 %
10		+			+	+	+	+		+	+	+	1	4.5 %
11	+	+	+	+	+	+		+		+			1	4.5 %
12	+	+	+	+	+			+	+				1	4.5 %
13	+	+	+	+	+	+				+			1	4.5 %
14	+	+	+	+	+	+	+	+				+	1	4.5 %
15	+	+	+	+	+			+		+			1	4.5 %
16	+	+						+			+		1	4.5 %
17	+	+			+		+	+		+		+	1	4.5 %

Tableau III: Profil d'expression des KIR dans la population contrôle (n = 19).

Phénotype	2DL1	2DL2	2DL3	3DL1	3DL2	2DL4	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	Nombre	Fréquence
1'	+		+	+	+	+		+		+			2	10.5 %
2'	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	2	10.5 %
3'	+	+	+	+	+	+		+		+			2	10.5 %
4'		+			+	+	+	+	+			+	1	5.2 %
5'	+	+	+	+		+		+					1	5.2 %
6'	+		+	+		+							1	5.2 %
7'	+	+	+		+	+		+	+	+			1	5.2 %
8'			+		+			+					1	5.2 %
9'	+	+	+	+		+	+					+	1	5.2 %
10'			+		+			+			+		1	5.2 %
11'	+	+	+		+	+							1	5.2 %
12'		+	+			+	+	+	+		+		1	5.2 %
13'	+	+	+	+	+	+		+	+	+			1	5.2 %
14'	+	+	+	+	+	+				+			1	5.2 %
15'	+		+	+	+	+		+		+		+	1	5.2 %
16'	+	+	+		+	+	+	+	+			+	1	5.2 %

**Discussion Générale
et
Perspectives**

Discussion Générale et Perspectives

Les cellules T CD8+NKR+ au cours de l'hépatite virale C chronique.

Une des questions à l'origine de ce travail concernait la possibilité que l'infection chronique par le VHC conduise à une expansion/accumulation de cellules T CD8+ exprimant des récepteurs inhibiteurs de type NKR. Il a été proposé que de telles cellules pourraient être associées à la stimulation antigénique chronique et à l'inflammation qui caractérise les infections virales persistantes (Anfossi et al., 2001 et 2004). En accord avec cette idée, des proportions accrues de ces cellules ont été observées chez des patients infectés par le VIH (De Maria et al., 1997 ; Costa et al., 2001).

Nous avons pu détecter dans le sang et le foie des patients des lymphocytes CD8+ qui expriment des récepteurs de molécules HLA I. Par stimulation *in vitro*, nous montrons que ces récepteurs présents sur des lymphocytes T CD8+ d'origine intrahépatique sont fonctionnels puisqu'ils peuvent réguler négativement la réactivité de ces cellules à une stimulation par le TCR (Figure C3). Cependant, nos résultats ne suggèrent pas de phénomène d'accumulation massive de ces cellules chez les patients atteints par l'hépatite virale C chronique (Article 1). Bien que nous n'ayons examiné que peu d'épitopes du VHC, nos données suggèrent que la fréquence de cellules T CD8+ spécifiques exprimant des NKR est faible. Etant donné que les récepteurs KIR sont exprimés par des cellules T CD8+ très différenciées (Anfossi et al., 2004), ce résultat est en accord avec l'observation que les cellules T CD8+ sont relativement moins différenciées dans l'hépatite C par rapport à d'autres infections virales. Il est donc peu probable que l'expression de NKR inhibiteurs par les cellules T CD8+ spécifiques puisse contribuer significativement à la persistance du virus. Il faut néanmoins souligner que l'expression de KIR par quelques rares cellules spécifiques du VHC révèle que ces quelques cellules présentent bien une différenciation poussée au cours de l'hépatite virale C chronique. La moindre différenciation phénotypique des cellules T CD8+ spécifiques du VHC les apparente plutôt aux T CD8+ cellules spécifiques de l'EBV par opposition aux cellules T CD8+ spécifiques du CMV (Appay, Dunbar et al., 2002; van Baarle, Kostense et al., 2002; Lucas, Vargas-Cuero et al., 2004). Nos résultats de l'analyse des NKR vont aussi dans le sens

de cette « parenté ». Ainsi, nous avons noté une fréquence un peu plus élevée de cellules LIR-1/ILT2/CD85j+ que de cellules KIR+ ou NKG2A+ parmi les cellules T CD8+ spécifiques du VHC. Malgré cela, cette fréquence de cellules LIR-1/ILT2/CD85j+ est faible par rapport à celle décrite pour les cellules T CD8+ spécifiques du CMV mais proche de celle décrite pour les cellules T CD8+ cellules spécifiques de l'EBV (Antrobus et al., 2005).

Nous avons noté une association forte du pourcentage des cellules CD8+CD94+ avec la charge virale sérique (Article 1). La signification possible de cette corrélation n'est pas claire. Premièrement, nous ne disposons pas toujours des valeurs de la charge virale intrahépatique qui semble plus pertinente que la charge sérique à cause de l'influence possible de facteurs extrahépatiques. De plus, dans la littérature, la virémie (même intrahépatique) ne corrèle pas de façon cohérente et reproductible avec les paramètres étudiés. Il n'y a ainsi pas nécessairement d'association claire entre la détection de réponses spécifiques et la charge virale des patients ; celle ci peut être forte même lorsque la présence de réponses T spécifiques anti-VHC est détectée.

Les modifications phénotypiques des cellules T CD8+NKR+ au cours de l'hépatite virale C chronique.

A cause de la très faible fréquence des cellules T CD8+ spécifiques du VHC, nous avons considéré que les modifications phénotypiques des cellules T CD8+ observées chez les patients reflètent probablement l'effet de « pervasive influence » décrit pour les cellules CMV spécifiques au cours de l'Hépatite C chronique (Lucas et al., 2004). Par exemple, parmi les cellules T CD8+ des patients, nous avons noté une augmentation de la fréquence de cellules CD45RO+ (40% (15-48) chez les patients versus 26% (17-34) chez des individus contrôles ($p = 0.0095$). Les conditions selon lesquelles, cet effet s'exerce ne sont pas connues. Il pourrait s'agir de mécanismes directs (interaction des virions avec les cellules) ou indirects (par effet de cytokines libérées durant l'inflammation). Notre étude montre que de telles différences phénotypiques peuvent concerner de façon différente certaines sous populations distinguées par l'expression de récepteurs NK particuliers. Par exemple, chez les patients, le niveau du marqueur de sénescence CD57 des cellules T CD8+ KIR+ est élevé par rapport à celui des cellules T CD8+ KIR+ des témoins tandis que celui des cellules T CD8+ NKG2A+ reste comparable dans les deux populations. La sensibilité des cellules T CD8+ à ce phénomène

pourrait être influencée par le cycle cellulaire puisque nous n'avons pas remarqué de modification phénotypique majeure des cellules NK au sens large chez les patients et que ces cellules se divisent *à priori* moins que les cellules T CD8 ayant un phénotype activé/mémoire.

Les cellules T CD8+ infiltrant le foie au cours de l'infection VHC chronique.

Par analyse *ex vivo*, nous avons mis en évidence une augmentation de la population T CD8⁺ intrahépatique avec le niveau de sévérité des lésions (Article 1). Ce résultat est en accord avec une observation plus ancienne du laboratoire montrant une accumulation des transcrits CD8 β dans le foie malade en fonction de la gravité des lésions (Leroy V et al., 2003) et des études histologiques indiquant un enrichissement de l'infiltrat lymphocytaire proinflammatoire en cellules CD8⁺ chez les patients VHC⁺ (Fiore et al., 1997 ; Galle et al., 2001). Ces cellules T CD8⁺, qui comme l'indiquent les études faites au moyen de complexes multimériques peptides VHC:molécules HLA I, sont dans leur grande majorité non spécifiques du VHC, sont, en l'absence de contrôles, probablement impliquées dans la nécrose et l'apoptose des hépatocytes au travers de la sécrétion de cytokines et/ou d'interactions cellulaires (Shoukry et al., 2004; Racanelli et al., 2003; Chisari et al., 2005; Bowen and Walker 2005).

Bien que nous n'ayons pas détecté de différences sensibles en terme de contenu intracellulaire en molécules anti-apoptotique bcl-2 entre cellules circulantes T CD8⁺ des patients et des contrôles (résultat non montré), l'ensemble des cellules circulantes CD8⁺ des patients semble moins sensible à la mort cellulaire associée à l'activation *ex vivo* (Figure C2). Ainsi, tandis que chez les contrôles, cette susceptibilité est réduite parmi les cellules CD8⁺KIR⁺, chez les patients, les cellules T CD8⁺KIR⁺ mais également CD8⁺KIR⁻ sont plus résistantes. Les cellules CD8⁺NKG2A⁺ et CD8⁺NKG2A⁻ sont elles aussi moins sensibles. Il est possible que cette caractéristique puisse contribuer à la persistance de l'ensemble des lymphocytes T CD8⁺ au sein du tissu hépatique malade et amplifier leurs effets délétères.

En situation normale, la population T CD8⁺ présente dans le tissu hépatique est régulée par des mécanismes de contrôle. Des données récentes indiquent que l'interaction de la molécule inhibitrice PD-1 avec son ligand (PDL-1) qui est exprimée de façon constitutive sur les cellules endothéliales des sinusoides et les cellules de Kupffer (Iwai et al., 2003) peut réguler l'accumulation/élimination des lymphocytes T CD8⁺ dans le foie. Ainsi, des souris déficientes en molécules PD-1 sont caractérisées par une accumulation spontanée de

lymphocytes T CD8⁺ dans le foie (Dong H et al., 2004). Chez ces animaux, la prolifération des cellules T CD8⁺ en réponse à l'antigène est normale mais la délétion de ces cellules dans le foie est affectée et peut conduire à des lésions hépatiques. En cas d'infection du foie par l'adénovirus, l'absence de PD-1 conduit à l'élimination rapide du virus qui en revanche persiste chez les contrôles (Iwai et al., 2003). Il serait important de déterminer si l'expression de PD-1 est significativement modulée sur les lymphocytes T CD8⁺ des patients infectés chroniquement par le VHC. Pour essayer d'examiner cet aspect, nous avons analysé les cellules T CD8⁺ des patients pour l'expression de PD-1 humain. Des expériences préliminaires sur un petit nombre d'échantillon n'ont pas révélé de différence forte entre cellules T CD8⁺ hépatiques et circulantes ou entre cellules T CD8⁺ circulantes de patients versus contrôles (résultats non montrés). Néanmoins, une étude plus complète mérite d'être faite, notamment une analyse fine d'expression en fonction de la sévérité des lésions. Chez l'homme, PDL-1 est exprimé également par les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales et faiblement par les hépatocytes. Cette expression est un peu accrue lors d'infections virales *in vitro* (adénovirus, HBV) mais elle l'est fortement par l'IFN- α (Muhlbauer et al., 2006). L'interaction PD-1-PDL-1 pourrait donc jouer un rôle dans les traitements utilisant l'IFN- α .

Un rôle pour les cellules NK-CTL dans les lésions hépatiques au cours de l'hépatite virale C chronique ?

Dans l'Article 1 des résultats nous décrivons une corrélation positive entre la fréquence des cellules T CD8⁺NKG2A⁺ infiltrant le foie et la gravité des lésions du tissu (score Métavir activité). Nous avons présenté des interprétations possibles de cette association dans la discussion. Il existe cependant une autre possibilité pour discuter ce résultat. Cette possibilité fait référence à la sous population des cellules dites NK-CTL (NK-cytotoxic T lymphocytes). Les NK-CTL sont des sous populations de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ de type mémoire qui expriment des récepteurs inhibiteurs spécifiques de molécules HLA I (notamment l'hétérodimère CD94-NKG2A) et sont capables de lyser efficacement de nombreuses cellules tumorales mais pas les cellules normales (Moretta L et al., 2003). Les NK-CTL utilisent leur TCR pour reconnaître HLA-E. Elles peuvent être détectées comme des populations oligoclonales ou clonales dans le sang circulant probablement en réponse à des

complexes peptides viraux :HLA-E. Il a été proposé que les NK-CTL pourraient tout comme les cellules NK, participer aux réponses contre les virus qui ont tendance à réduire l'expression des molécules HLA I sur les cellules infectées (comme c'est le cas du CMV) et qui peuvent ainsi échapper à la réponse médiée par les cellules T CD8+ antivirales classiques.

On sait que HLA-E peut présenter le peptide core35-44 qui correspond à une zone conservée chez le VHC, en surface des cellules infectées (Natterman et al., 2005). Il est donc en théorie possible que le complexe core35-44:HLA-E puisse être reconnu par le TCR $\alpha\beta$ de cellules NK-CTLs et que l'association que nous décrivons reflète cette reconnaissance et la destruction des cellules infectées qui pourrait en résulter. Toutefois, à la différence du CMV, l'infection par le VHC ne diminue pas (mais au contraire augmente sensiblement) le niveau d'expression des molécules HLA I sur les cellules cibles. Cet effet pourrait compromettre le chargement de HLA-E par un/des peptides du VHC car, à la différence d'une cellule infectée par un virus qui réduit l'expression des HLA I, le(s) peptide(s) VHC capables de lier HLA-E sont alors toujours en forte compétition avec les peptides leaders des HLA I. De plus, une bonne expression des HLA I peut permettre d'engager des KIR inhibiteurs qui peuvent aussi être présents sur les NK-CTL (comme KIR2DL1 et KIR2DL2) et l'on sait que ces KIR peuvent inhiber efficacement la réactivité des NK-CTLs lorsque les cibles présentent un niveau HLA I normal. (Moretta et al., 2003). Enfin, dans le foie malade, le niveau d'expression de HLA-E n'est pas un facteur limitant, il est au contraire fortement exprimé par les cellules de Kupffer, les LSEC, des cellules dendritiques et aussi des monocytes (Natterman et al., 2005) et il est une source d'inhibition efficace via NKG2A (même complexé au peptide core35-44). Pour ces raisons, il est peu probable que l'interaction du TCR de NK-CTL avec des complexes peptide(s) VHC:HLA-E empêche (par effet de compétition) NKG2A d'interagir avec son ligand inhibiteur. Tous ces facteurs pourraient, à la différence d'une infection par le CMV, ne pas permettre une activation efficace des NK-CTL lors de l'infection persistante par le VHC. En accord avec cela, des travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'il n'existe pas de biais significatif du répertoire TCR BV ou BJ dans le foie des patients par rapport à du foie normal (Vigan et al., 2003) or il semble que l'activation des NK-CTL *in vivo* se traduise au contraire par l'expansion de cellules porteuses de domaines BV particuliers (Moretta et al., 2003).

Néanmoins l'hypothèse que des NK-CTL puissent être activés dans le foie malade devra être testée directement. Il serait tout d'abord important de tester si parmi les cellules T CD8+NKR+, il existe des cellules qui répondent au complexe core35-44:HLA-E *in vitro*. Ceci pourrait être examiné avec des cellules du sang des patients mais des expériences faites

avec des cellules fraîchement extraites du foie seraient plus informatives bien que plus difficiles. Des essais de comarquage des cellules T CD8+NKG2A+ d'origine intrahépatique par différent anticorps anti-V β pourraient aussi être tentés pour rechercher d'éventuels biais.

Pour revenir à l'association entre la fréquence des cellules T CD8+NKG2A+ infiltrant le foie et la gravité des lésions, il serait intéressant de rechercher la distribution de ces cellules dans le tissu. Ainsi, des essais de comarquage de coupes histologiques de foie par anti-CD8 β plus anti-NKG2A pourraient aider à déterminer la distribution de ces cellules par rapport aux zones de nécrose.

Enfin, une étude de l'expression des récepteurs de chimiokines par les cellules T CD8+NKR+ en général (et les cellules T CD8+NKG2A+ en particulier) qui infiltrent le foie malades permettrait d'estimer leur potentiel de recirculation.

Les Cellules NK des patients infectés par le VHC.

Lors de l'analyse du compartiment NK des patients, des altérations de la représentation des cellules NK, mais aussi de certaines de leur sous populations, ont été notées : réduction de la fréquence des cellules NK circulantes avec modification du ratio des sous types CD56^{dim} et CD56^{bright}. Dans le foie malade, la fréquence des cellules NK apparaît bien inférieure à celle caractérisant un foie sain et qui est décrite dans la littérature. Nous avons eu recours à ces valeurs car il ne nous était pas possible d'utiliser des échantillons de foie humain complètement dépourvus de pathologie. D'une façon générale, ceci a parfois restreint l'interprétation des résultats obtenus avec les cellules intrahépatiques au cours de ce travail.

Nous avons aussi observé une augmentation de la fréquence des cellules NK du sang qui expriment CD94 (Article 2). Cet effet a été détecté dans une étude indépendante (Jinushi, et al. 2004) mais dans cette dernière, une augmentation de la fréquence des cellules NK NKG2A+ a aussi été observée, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Nous n'avons pas d'explication claire pour cette différence. Par exemple la taille des échantillons n'est pas très différente contrôles = 18 et patients = 28 dans notre étude versus contrôles = 10 et patients = 15 pour Jinushi et al. Il est possible que l'association négative que nous observons entre la charge virale sérique et la fréquence des cellules NK NKG2A+ puisse contribuer à cette différence. Ainsi, selon la virémie des patients impliqués dans ces études (non détaillée dans Jinushi et al.), la fréquence des cellules NK NKG2A+ de l'échantillon pourraient être sensiblement modulée. Il est aussi possible que des différences génétiques soient en cause

(cohorte de patients caucasiens versus asiatiques). Néanmoins, l'analyse d'expression de NKG2A a révélé une corrélation positive entre la fréquence de la fraction CD56^{bright} des cellules NK NKG2A⁺ du sang et la sévérité des lésions et de la fibrose.

D'une façon générale, nous n'avons pas noté de variation de la proportion des quelques cellules NK qui n'expriment pas CD56 (CD3-CD56-NKRs+) chez les patients. Cependant, une étude plus fine de ce compartiment pourrait être faite pour clarifier cet aspect par exemple au moyen de comarquages CD16, car des expansions de cellules NK CD56-CD16⁺ caractérisées par une faible activité cytolytique à été décrite dans l'infection chronique par le VIH (Eger et Unutmaz 2004; Mavilio et al. 2005). De même, il n'existe pas d'information sur le statut des cellules NK immatures CD56-CD161⁺ (Perussia et al., 2005) durant l'hépatite virale C chronique.

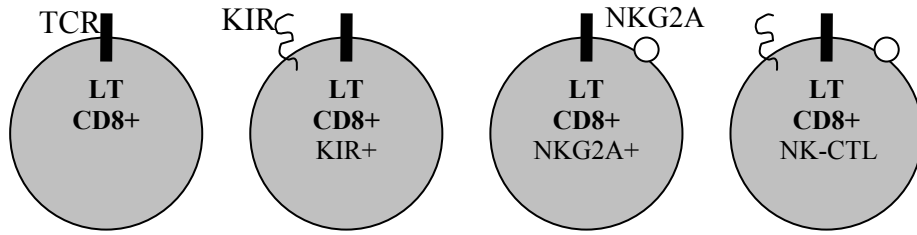
En ce qui concerne la sous population des cellules NK qui exprime CD8 (Article 3), nous avons observé des altérations semblables à celles des cellules NK dans leur ensemble. Ainsi, la fréquence des cellules NKCD8⁺ est réduite chez les patients et leur répartition entre cellules CD56^{dim} et CD56^{bright} est aussi altérée. Au niveau du foie, une corrélation positive entre la fréquence des cellules NKCD8⁺ infiltrantes et le taux sérique des transaminases. Cette association est confirmée (et étendue aux paramètres histologiques) pour la fraction des NKCD8⁺ CD158b_j⁺ intrahépatiques. En raison de son fort potentiel cytotoxique, la sous population NKCD8⁺ pourrait en théorie participer au développement des lésions. Bien que des données obtenues *in vitro* suggèrent que les cellules NK puissent contrôler la répllication du VHC dans les hépatocytes (Li et al. 2004), il n'existe pas actuellement de données impliquant les lymphocytes NK de façon importante dans la réponse antivirale et dans le développement des lésions du foie. En accord théorique avec cela, il existe plusieurs moyens pour le VHC d'interférer avec la réponse des cellules NK de l'hôte (voir la discussion des Articles 2 et 3). Cependant on ne sait pas si les cellules NK CD8⁺ partagent le même niveau de susceptibilité que les autres cellules NK vis à vis de ces facteurs et donc si elles sont sensibles à l'influence du virus. Par exemple, il serait important d'analyser si la population NK CD8⁺ est aussi sensible aux effets inhibiteurs de l'engagement de CD81 par la protéine E2 par rapport aux autres cellules NK. Il est possible de détecter des signes d'activation des cellules NK CD8⁺ chez les patients. Par exemple sur plusieurs patients testés, 10 à 20 % des cellules NK CD8⁺ expriment NKp44 en surface alors que cette fréquence est de l'ordre de 1% chez les contrôles en accord avec le fait que ce récepteur est absent des cellules NK non activées (résultats non montrés). Par ailleurs, des informations sur le rôle des NKCD8⁺ dans l'hépatite C chronique

ont pu être masquées dans certaines études en raison de l'expression de CD8. Ainsi, des examens histologiques basés sur des marquages simultanés de molécules CD8 α -Perforine ou CD8 α -Granzymes ne font pas la distinction entre LT CD8 $^{+}$ et cellules NK CD8 $^{+}$. Il en est de même des expériences de déplétion des cellules CD8 $^{+}$ au moyen d'anticorps anti-CD8 α dans des modèles animaux d'infection par le VHC.

Conclusion.

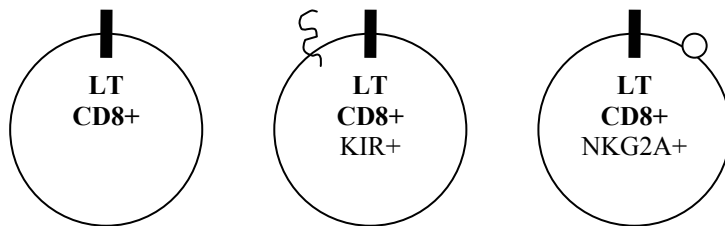
Nous avons analysé, chez les patients infectés de façon chronique par le VHC, les populations lymphocytaires sanguines et intrahépatiques exprimant des récepteurs de molécules HLA de classe I (NKG2A et des membres du groupe KIR) qui sont très importants pour la régulation des cellules NK mais qui peuvent aussi être exprimés par les lymphocytes T CD8 $^{+}$ activés/mémoires. Nous n'avons pas détecté de phénomènes d'accumulation massive de ces cellules chez les patients y compris dans l'infiltrat T CD8 $^{+}$ qui est important au niveau du foie malade. Au niveau des cellules NK, nos résultats indiquent une dérégulation de la fréquence des cellules circulantes chez les malades avec une modification de représentation des sous types CD56 dim et CD56 bright . Ceci est retrouvé au sein de la fraction NKCD8 $^{+}$. Dans le foie, la fréquence des cellules NK apparaît bien inférieure à celle caractérisant un foie humain normal. Ces altérations pourraient refléter l'interférence du VHC avec la réponse antivirale des cellules NK de l'hôte. Dans leur ensemble, nos résultats montrent donc que l'analyse de l'expression de récepteurs de molécules HLA de classe I met en évidence de multiples altérations de la représentation de sous populations lymphocytaires T et NK au cours de l'hépatite virale C chronique et révèle des associations positives de certaines de ces sous populations avec des paramètres cliniques majeurs de la maladie.

A. Lymphocytes T CD8+ spécifiques d'antigènes du VHC.



Fréquence	Très faible	Rare	Rare	?
Interaction Activatrice	TCR: (HLA I + pep.)	TCR: (HLA I + pep.)	TCR: (HLA I + pep.)	TCR: (HLA E + pep.) ?
Interaction Inhibitrice		KIR:HLA I*	NKG2A:HLA-E** NKG2A:(HLA-E + pep.)#	KIR:HLA I* NKG2A:HLA-E** NKG2A:(HLA-E + pep.)#
Destruction Hépatocytes Infectés	+	---/+	---/+	----

B. Lymphocytes T CD8+ non spécifiques (réactivité croisée).



Fréquence	Elevée	Faible	Faible
Interaction Activatrice	TCR: HLA I	TCR: HLA I	TCR: HLA I
Interaction Inhibitrice		KIR:HLA I*	NKG2A:HLA-E** NKG2A:(HLA-E + pep.)#
Destruction Hépatocytes	++++	--/+	--/+

Synopsis des interactions récepteur:ligand affectant probablement les cellules T CD8+ intrahépatiques et estimation de la contribution relative de ces cellules aux lésions tissulaires associées à l'hépatite virale C chronique.

En raison de leur très faible fréquence, les LT CD8+ spécifiques du virus (**A**) contribuent probablement que peu aux lésions hépatiques. Très peu de ces cellules expriment des NKRs qui, bien que fonctionnels, ne semblent pas donc en cause dans l'évolution vers la chronicité. L'existence de cellules T CD8+ de type NK-CTLs spécifiques du VHC reste hypothétique. Leur réactivité potentielle serait probablement fortement inhibée (voir discussion).

Dans le cas des nombreux LT CD8+ activés qui sont recrutés dans le foie sous l'effet de l'inflammation (**B**), leur participation substantielle à la destruction des hépatocytes peut être due à des réactivités croisées. Les NKRs ne peuvent pas contrôler efficacement cette réactivité car, bien que leurs ligands semblent disponibles, ces récepteurs ne sont présents que sur des fractions relativement limitées de ces LT CD8+.

* l'interaction KIR:HLA I est probablement productive car le VHC induit une expression soutenue des molécules HLA I (et donc également de leur peptide leader capable de s'associer à HLA-E).

** HLA-E est fortement exprimé par différents types cellulaires dans le foie infecté.

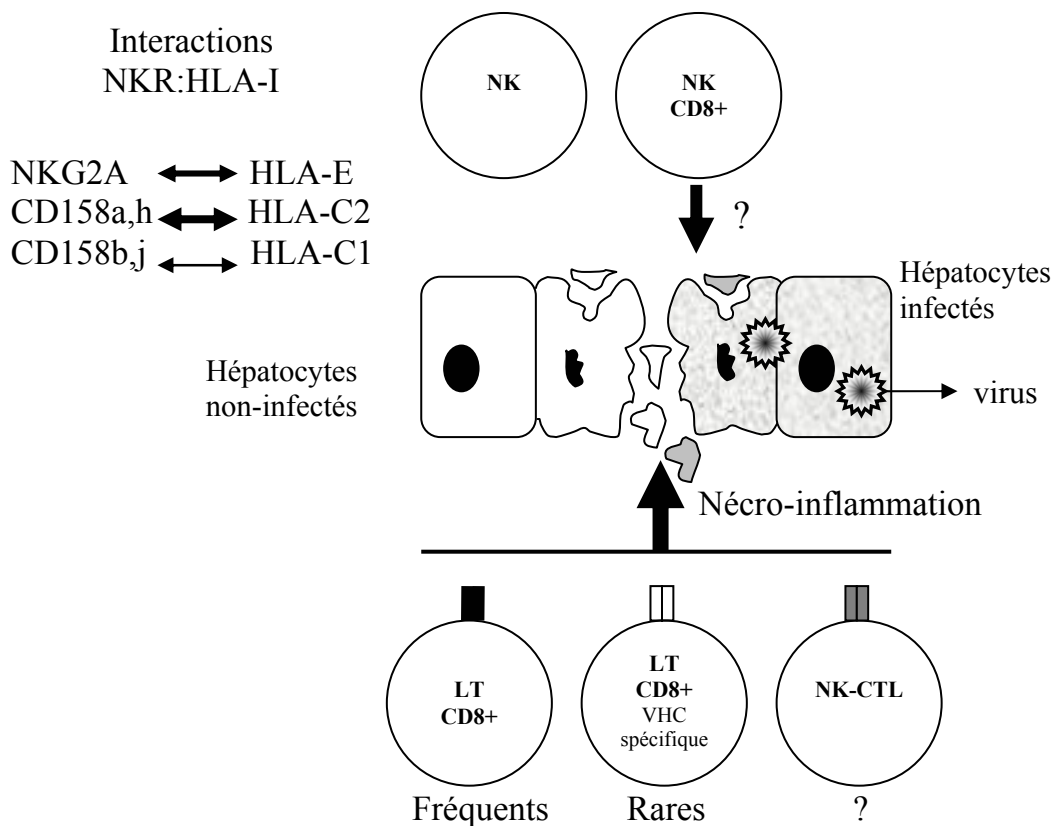
l'interaction NKG2A:HLA-E peut délivrer un signal inhibiteur même lorsque HLA-E est associé au peptide VHC Core 35-44.

HLA I = HLA-A/B/C + peptides du soi,

(HLA I + pep.) = HLA-A/B/C + peptides VHC,

HLA-E = HLA-E + peptide leader HLA I,

(HLA-E + pep.) = HLA-E + peptide VHC.



Représentation schématique situant les lymphocytes T CD8+ et NK intra-hépatiques vis à vis de la nécro-inflammation lors de l'hépatite virale C chronique.

Les rares LT CD8+ spécifiques du VHC sont susceptibles de lyser des hépatocytes infectés (en gris) mais aussi des hépatocytes non infectés. Les nombreux autres LT CD8+ sont susceptibles de lyser les hépatocytes de façon non antigène-spécifique. Comme discuté précédemment, la présence de LT CD8+ de type NK-CTLs spécifiques du VHC n'est pas connue. Tandis qu'un rôle pour les NK au sens large dans les lésions du foie n'est pas étayé, nos résultats posent la question d'une possible contribution de la fraction des lymphocytes NKCD8+ qui expriment CD158b,j. De part la relative faible affinité de l'interaction de CD158b,j avec HLA-C1, l'activité cytolytique de ces cellules pourraient être moins contrôlées que les cellules NKCD8+ qui expriment CD158a,h ou NKG2A. Au niveau histologique, la participation de cellules NKCD8+ aux lésions pourrait avoir été assimilée à celle des LT CD8+ en raison de l'usage fréquent d'anticorps anti-CD8 α .

Références Bibliographiques

REFERENCES

A

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793.
- Abramson, J., Xu, R. & Pecht, (2002) I. An unusual inhibitory receptor-the mast cell function-associated antigen (MAFA). *Mol. Immunol.* 38, 1307–1313.
- Accapezzato, D. et al. (2004) Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 113 (7), 963-972
- Adrain C., Duriez P. J., Brumatti G., Delivani P., and Martin S. J. (2006) The Cytotoxic Lymphocyte Protease, Granzyme B, Targets the Cytoskeleton and Perturbs Microtubule Polymerization Dynamics *J. Biol. Chem.*; 281(12): 8118 - 8125.
- Agnello, V. et al. (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (22), 12766-12771
- Agrati, Alonzi, (2005) Activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication *International Immunology*, Vol. 18, No. 1, pp. 11–18
- Agrati C., D'Offizi G., Narciso P., Abrignani S., Ippolito G., Colizzi V., Poccia F, (2001) Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gamma delta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons, *Mol. Med.* 7, 11 –19.
- Aguado, E. *et al.* (1999) Functional expression of CD43 on human natural killer cells. *J. Leukocyte Biol.* 66, 923–929
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413 (6857), 732–738.
- Andre, P., C. Brunet, et al. (1999). Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *Eur J Immunol* 29(4): 1076-85.
- Andre, P. *et al.* (2000) Modification of P-selectin glycoprotein ligand 1 with a natural-killer-cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3400–3405
- André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S. et al (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76, 6919–6928.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S., Randall, R.E., (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (49), 17264–17269.
- Andersen et al (2006) Cytotoxic T cells *J of Investigative dermatology* 126, 32-41
- Anfossi, N., Pascal, V., Vivier, E. & Ugolini, S. (2001) Biology of T memory type 1 cells. *Immunol. Rev.* 181, 269–278
- Anfossi N, Doisne JM, Peyrat MA, Ugolini S, Bonnaud O, Bossy D, Pitard V, et al. (2004) Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8+ T cells. *J Immunol* 173:7223-7229.

- Anthony D. D., Yonkers N. L., Post A. B., Asaad R., Heinzl F. P., Lederman M. M., Lehmann P. V. and Valdez H. (2004) Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol* 172, 4907-16.
- Antrobus RD, Khan N, Hislop AD, Montamat-Sicotte D, Garner LI, Rickinson AB, Moss PA, et al. (2005) Virus-specific cytotoxic T lymphocytes differentially express cell-surface leukocyte immunoglobulin-like receptor-1, an inhibitory receptor for class I major histocompatibility complex molecules. *J Infect Dis*;191:1842-1853.
- Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, et al. (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* 8:379–85
- Arase, H., Arase, N., Saito, T., (1995). Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J. Exp. Med.* 181, 1235–1238.
- Arnon T.I., Lev M., Katz G., Chernobrov Y., Porgador A. and Mandelboim O., (2001) Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30, *Eur. J. Immunol.* **31**, pp. 2680–2689.
- Aste-Amezaga, M. *et al.* (1994) Cooperation of natural-killer-cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell associated molecules in human T and NK cells. *Cell. Immunol.* 156, 480–492
- B**
- Bain, C., Fatmi, A., Zoulim, F., Zarski, J.P., Trepo, C., and Inchauspe, G. (2001). Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology.* 120:512-524.
- Bakker, A. B., Phillips, J. H., Figdor, C. G. & Lanier, L. L. (1998) Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J. Immunol.* 160, 5239–5245.
- Balk, S.P., Burke, S., Polischuk, J.E., Frantz, M.E., Yang, L., Porcelli, S., Colgan, S.P., and Blumberg, R.S. (1994). Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science.* 265:259-262.
- Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA (2002) Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med.*;196(4):493-503.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18:767-811.
- Barry M, Bleackley RC (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* 2 (6):401-9.
- Bartosch B, Bukh J, Meunier JC et al., (2003a). In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *PNAS* 100: 14199-204.
- Bartosch B, Dubuisson J and Cosset FL. (2003b). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197: 633-42.
- Bashirova A A., Martin M P., McVicar D W., and Carrington M (2006) The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7:277–300
- Battaller R and Brenner D A (2005) Liver fibrosis *The Journal of Clinical Investigation* Volume 115 Number 2

- Battaller, R., Paik, Y.H., Lindquist, J.N., Lemasters, J.J., and Brenner, D.A. (2004). Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 126:529–540.
- Battegay, M., J. Fikes, A. M. Di Bisceglie, P. A. Wentworth, A. Sette, E. Celis, W. M. Ching, A. Grakoui, C. M. Rice, K. Kurokohchi, and et al. (1995). Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus-encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecules. *J Virol* 69:2462.
- Bauer, S. *et al.* (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–729
- Baume, D.M. *et al.* (1992) Differential responses to interleukin-2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur. J.Immunol.* 22, 1–6
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M et al. (2003) Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*; 130:65–74.
- Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 10:585–94
- Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, Jaju M, Lieberman J. (2001) Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem.*; 276(46):43285-93.
- Berland, R., Wortis, H.H., (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 253–300.
- Bertoletti A., D'Elisio M. M., Boni C., De Carli M., Zignego A. L., Durazzo M., Missale G., Penna A., Fiaccadori F., Del Prete G. and Ferrari C. (1997) Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 112, 193-9.
- Bertoletti, A. and M. K. Maini (2000). Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Immunol* 12(4): 403-8.
- Bertolino P., McCaughan G. W. and Bowen D. G. (2002) Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol* 80, 84-92.
- Bertolino, P., Trescol-Biemont, M.C., and Rouboudin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol.* 28:221-236.
- Bertone, S. *et al.* (1999). Transforming growth factor-beta induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29, 23–29
- Biron, C.A. (1997). Natural killer cell regulation during viral infection. *Biochem Soc Trans.* 25:687-690.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu.Rev.Immunol.* 17:189-220.
- Blight, K., Trowbridge, R., Rowland, R., and Gowans, E. (1992). Detection of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization. *Liver.* 12:286-289.
- Bode, J.G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P.C., Haussinger, D., (2003). IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J.* 17 (3), 488–490.

- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.*;15:749-95.
- Born, W., Yague, J., Palmer, E., Kappler, J., and Marrack, P. (1985). Rearrangement of T-cell receptor beta-chain genes during T-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:2925-2929.
- Bossi, G., Griffiths, G.M., (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat. Med.* 5, 90–96.
- Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, Landi E, Biassoni R, Notarangelo LD, Moretta L, Moretta A. (2001) NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med.* 194(3):235-46.
- Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. (2003) Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.* 198(4):557-67.
- Bowen, D. G. and C. M. Walker (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436(7053): 946-52.
- Bowen D and Walker C M. (2005) Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man *JEM* Vol. 201, No. 11, pp 1709–1714
- Burkhardt JK, Hester S, Lapham CK, Argon Y. (1990) The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol.*;111:2327-40.
- Bukh J, Miller RH, Purcell RH. (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.* 15:41–63
- Bumgardner GL, Matas AJ, Chen S, Cahill D, Cunningham TR, Payne WD, Bach FH, Ascher NL. (1990) Comparison of in vivo and in vitro immune response to purified hepatocytes. *Transplantation.*;49(2):429-36.
- Burton, D.R., Williamson, R.A., and Parren, P.W. (2000). Antibody and virus: binding and neutralization. *Virology.* 270:1-3.
- C**
- Cabrera, R. *et al.* (2004). An immunomodulatory role for CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40, 1062–1071
- Caligiuri M.A., Zmuidzinas A., Manley T.J., Levine H., Smith K.A. and J. Ritz. (1990) Functional consequences of IL-2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel NK cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* 171, 1509-26.
- Campbell, J.J. *et al.* (2001) Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* 166, 6477–6482
- Canchis, P.W., Bhan, A.K., Landau, S.B., Yang, L., Balk, S.P., and Blumberg, R.S. (1993). Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology.* 80:561-565.
- Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R (1999) Nkp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human Natural Killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189: 787–796

- Cantor, H.M., and Dumont, A.E. (1967). Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature*. 215:744-745.
- Carrington M, Norman P (2003) The KIR gene cluster NIH
- Carson, W.E. *et al.* (1995) The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 85, 3577–3585
- Carson, W.E. *et al.* (1994) The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the up-regulation of bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7553–7557
- Carson, W.E. *et al.* (1994) Interleukin (IL)-15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 180, 1395–1403
- Catalfamo M and Henkart P A (2003) Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway *Current Opinion in Immunology*, 15:522–527
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Barthelemy, C., Liu, Y.J., and Banchereau, J. (1994). Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol.* 6:1177-1185.
- Cerny A., McHutchison J. G., Pasquinelli C., Brown M. E., Brothers M. A., Grabscheid B., Fowler P., Houghton M. and Chisari F. V. (1995) Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA A2.1 binding motif. *J Clin Invest* 95, 521-30.
- Cerundolo V., (2001) Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 3294– 3298.
- Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Forster R, Rowland-Jones S, Sekaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G.(2001) Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*.;410(6824):106-11
- Chang, K.M., Thimme, R., Melpolder, J.J., Oldach, D., Pemberton, J., Moorhead-Loudis, J., McHutchison, J.G., Alter, H.J., and Chisari, F.V. (2001). Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 33:267-276.
- Chang KM, Rehmann B, McHutchison JG, Pasquinelli C, Southwood S, Sette A, Chisari FV. (1997) Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J.Clin.Invest.*;100:2376-85
- Chang, M., Marquardt, A.P., Wood, B.L., Williams, O., Cotler, S.J., Taylor, S.L., Carithers, R.L., Jr., and Gretch, D.R. (2000). In situ distribution of hepatitis C virus replicative-intermediate RNA in hepatic tissue and its correlation with liver disease. *J Virol.* 74:944-955.
- Chen G & Goeddel D.V. (2002) TNF-R1 signalling : a beautiful pathway *Science* 296, 1634-1635
- Chen, M., Sallberg, M., Sonnerborg, A., Weiland, O., Mattsson, L., Jin, L., Birkett, A., Peterson, D., Milich, D.R., (1999). Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 116 (1), 135–143.
- Chisari, F.V. (1997). Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J.Clin.Invest.* 99:1472-1477.
- Chisari FV. (2005) Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 436:930-932.
- Chisholm SE, Reyburn HT. (2006) Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *J Virol.* 80(5):2225-33.
- Chwae, Y. J. *et al.* (2002). Molecular mechanism of the activation-induced cell death inhibition mediated by a p70 inhibitory killer cell Ig-like receptor in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 169, 3726–3735

- Clayberger, C., Krensky, A.M., (2003). Granulysin. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 560–565.
- Cocquerel L, Voisset C and Dubuisson J. (2006), Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions *Journal of General Virology* 87, 1075–1084
- Collins C., Norris S., McEntee G., Traynor O., Bruno L., von Boehmer H., Hegarty J. and O'Farrelly C. (1996) RAG1, RAG2 and pre-T cell receptor alpha chain expression by adult human hepatic T cells: evidence for extrathymic T cell maturation. *Eur J Immunol* 26, 3114-8.
- Colonna, M., Krug, A., Cella, M., (2002). Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 14 (3), 373–379.
- Colucci F., Caligiuri M.A., Di Santo J.P., (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.* 3 413– 425.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Fuchs, A., Colonna, M. & Caligiuri, M. A. (2004). NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 25, 47–52
- Cooper, M.A. *et al.* (2001) Interleukin-1 beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 792–801
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.*;97(10):3146-51.
- Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A., (2001) The biology of human natural killer-cell subsets, *Trends Immunol.* 22 633– 640.
- Cooper S., Erickson A. L., Adams E. J., Kansopon J., Weiner A. J., Chien D. Y., Houghton M., Parham P. and Walker C. M. (1999) Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10, 439-49.
- Cooper, N.R., and Nemerow, G.R. (1983). Complement, viruses, and virus-infected cells. *Springer Semin Immunopathol.* 6:327-347.
- Corado, J., F. Toro, et al. (1997). Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 109(3): 451-7.
- Corral, L., Hanke, T., Vance, R. E., Cado, D. & Raulet, D. H. (2000). NK cell expression of the killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1), the mouse homolog of MAFA, is modulated by MHC class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 30, 920–930
- Cosman, D. *et al.* (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123-133
- Costa P, Rusconi S, Mavilio D, Fogli M, Murdaca G, Pende D, Mingari MC, Galli M, Moretta L, De Maria A. (2001) Differential disappearance of inhibitory natural killer cell receptors during HAART and possible impairment of HIV-1-specific CD8 cytotoxic T lymphocytes. *AIDS.*15:965-74.
- Cox, A.L., T. Mosbrugger, Q. Mao, Z. Liu, X.-H. Wang, H.-C. Yang, J. Sidney, A. Sette, D. Pardoll, D.L. Thomas, and S.C. Ray. (2005) Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J. Exp.Med.* 201:1741–1752.
- 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
- Crispe, I.N., Dao, T., Klugewitz, K., Mehal, W.Z., and Metz, D.P. (2000). The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev.* 174:47-62.

- Crispe I. N. (2003) Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 51-62.
- Crispe, I.N., and Mehal, W.Z. (1996). Strange brew: T cells in the liver. *Immunol.Today*. 17:522-525.
- Crosbie O. M., Reynolds M., McEntee G., Traynor O., Hegarty J. E. and O'Farrelly C. (1999) In vitro evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology* 29, 1193-8.
- Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol*. 12:259-293.
- Crotta, S., A. Stilla, et al. (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 195(1): 35-41.
- Crovatto, M., Pozzato, G., Zorat, F., Pussini, E., Nascimben, F., Baracetti, S., Grando, M.G., Mazzaro, C., Reitano, M., Modolo, M.L., Martelli, P., Spada, A., and Santini, G. (2000). Peripheral blood neutrophils from hepatitis C virus-infected patients are replication sites of the virus. *Haematologica*. 85:356-361.
- Cucchiari, M., Kammer, A.R., Grabscheid, B., Diepolder, H.M., Gerlach, T.J., Gruner, N., Santantonio, T., Reichen, J., Pape, G.R., and Cerny, A. (2000). Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cell Immunol*. 203:111-123.
- Curry, M.P., Golden-Mason, L., Nolan, N., Parfrey, N.A., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., (2000). Expansion of peripheral blood CD5+ B cells is associated with mild disease in chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol*. 32, 121–125.
- Curry, Norris et al (2000) Isolation of lymphocytes from normal adult human liver suitable for phenotypic and functional characterisation *Journal of Immunological Methods* 242, 21–31
- Curry, M.P., Golden-Mason, L., Doherty, D.G., Deignan, T., Norris, S., Dufy, M., Nolan, N., Hall, W., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., (2003). Expansion of innate CD5(pos) B cells expressing high levels of CD81 in hepatitis C virus infected liver. *J. Hepatol*. 38, 642–650.
- Cuturi MC, Anegon I, Sherman F, Loudon R, Clark SC, Perussia B, Trinchieri G. (1989) Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med*. 169(2):569-83.
- D**
- Dalod, M., Dupuis, M., Deschemin, J.C., Sicard, D., Salmon, D., Delfraissy, J.F., Venet, A., Sinet, M., and Guillet, J.G. (1999). Broad, intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex vivo CD8(+) responses in HIV type 1-infected patients: comparison with anti-Epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapy. *J Virol*. 73:7108-7116.
- D'Andrea, A., Chang, C., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. (1996). Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J. Exp. Med*. 184, 789–794
- Day, C. L., G. M. Lauer, et al. (2002). Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 76(24): 12584-95.
- Day, C. L., N. P. Seth, et al. (2003). Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest* 112(6): 831-42.
- De Francesco R. and Migliaccio G. (2005) Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C *Nature* Vol 436 p 953
- Degli-Esposti, M. A. & Smyth, M. J. (2005) Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Rev. Immunol*. 5, 112–124

Della Chiesa M, Vitale M, Carlomagno S, Ferlazzo G, Moretta L, Moretta A. (2003) The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors *Eur J Immunol.*;33: 1657-1666.

De Maria, A. *et al.* (1997). Expression of HLA class I-specific inhibitory natural killer cell receptors in HIV-specific cytolytic T lymphocytes: impairment of specific cytolytic functions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 10285–10288

Derre, L. *et al.* (2002). Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* 168, 4864–4870

de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., Williams, B.R., (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J. Leukoc. Biol.* 69 (6), 912–920.

Diebold, S.S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L.E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., Reis e Sousa, C., (2003). Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424 (6946), 324–328.

Diepolder H. M., Gerlach J. T., Zachoval R., Hoffmann R. M., Jung M. C., Wierenga E. A., Scholz S., Santantonio T., Houghton M., Southwood S., Sette A. and Pape G. R. (1997) Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 71, 6011-9.

Diepolder, H. M. *et al.* (1995). Possible mechanism involving T lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346, 1006–1007

Di Santo J. P. , (2006) Natural Killer Cell Developmental Pathways: A Question of Balance *Annu. Rev. Immunol.* 24:257–86

Doherty, D.G., and O'Farrelly, C. (2000). Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol.Rev.* 174:5-20.

Doherty, D. G., S. Norris, et al. (1999). The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 163(4): 2314-21.

Dong H., Zhu G., Tamada K., Flies D., van Deursen J.M.A. and L. Chen. (2004). B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8+ T lymphocytes. *Immunity* 20, 327-336.

Dulphy, N. *et al.* (2002). Functional modulation of expanded CD8⁺ synovial fluid T cells by NK cell receptor expression in HLA-B27-associated reactive arthritis. *Int. Immunol.* 14, 471–479

Duong, F.H., Filipowicz, M., Tripodi, M., La Monica, N., Heim, M.H., (2004). Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology* 126 (1), 263–277.

E

Eger K and Unutmaz D. (2004). Perturbation of natural killer cell function and receptors during HIV infection. *Trends Immunol.*, 12, 301-3.

Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* 76 (12), 5974–5984.

Erickson A. L., Kimura Y., Igarashi S., Eichelberger J., Houghton M., Sidney J., McKinney D., Sette A., Hughes A. L. and Walker C. M. (2001) The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15, 883-95.

F

- Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Lieberman J. (2002) HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Mol Cell Biol.*;22(8):2810-20.
- Fan Z., Beresford P.J., Oh D.Y., Zhang D. Lieberman J (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a Granzyme A activated DNase during CTL mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor *Cell* 112 659-672
- Fanning L.J., Kenny-Walsh E. and Shanahan F. (2004) Persistence of hepatitis C virus in a white population: association with human leukocyte antigen class 1. *Human Immunology* 65, 745-751.
- Farci, P., Alter, H.J., Govindarajan, S., Wong, D.C., Engle, R., Lesniewski, R.R., Mushahwar, I.K., Desai, S.M., Miller, R.H., Ogata, N., et al., (1992). Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258 (5079), 135–140.
- Farci P, Shimoda A, Wong D et al., (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmun serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *PNAS* 93: 15394-99.
- Faure, F., Jitsukawa, S., Miossec, C., and Hercend, T. (1990). CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood gamma/delta cells. *Eur J Immunol.* 20:703-706.
- Fehniger, T.A. *et al.* (1999) Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J. Immunol.* 162, 4511–4520
- Fehniger, T. A., M. A. Cooper, G. J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, M. A. Caligiuri. (2003). CD56^{bright} natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101:3052
- Feld J. and Hoofnagle J (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C *Nature* vol 436 p 967
- Ferlazzo G, Tsang M-L, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.*;195: 343-351
- 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(2):286-95.
- Ferrini, S. *et al.* (1994). T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function. *Eur. J. Immunol.* 24, 2294–2298
- Fiore G, Angarano I, Caccetta L, Serrone M, Jirillo E, Schiraldi O, Antonaci S. (1997) In-situ immunophenotyping study of hepatic-infiltrating cytotoxic cells in chronic active hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9:491-496.
- Fisher RC, Thorley-Lawson DA. (1991) Characterization of the Epstein-Barr virus-inducible gene encoding the human leukocyte adhesion and activation antigen BLAST-1 (CD48). *Mol Cell Biol.* (3):1614-23.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., Maniatis, T., (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4 (5), 491–496.

Folgori A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, Pezzanera M, Tafi R, Arcuri M, Fattori E, Lahm A, Luzzago A, Vitelli A, Colloca S, Cortese R, Nicosia A. (2006) A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med.*;12(2):190-7.

Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter Jr., R., Ikeda, M., Lemon, S.M., Gale Jr., M., (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300 (5622), 1145–1148.

Freeman AJ, Pan Y, Harvey CE, Post JJ, Law MG, White PA, Rawlinson WD, Lloyd AR, Marinos G, Ffrench RA. (2003) The presence of an intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response is associated with low viral load in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol.*;38(3):349-56.

Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, Mao HC, Ferketich AK, et al. (2005). A human CD34+ subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56^{bright} natural killer cells. *Immunity* 22:295–304

Frey, M. *et al.* (1998) Differential expression and function of L-selectin on CD56^{bright} and CD56dim natural-killer-cell subsets. *J. Immunol.* 161, 400–408

Friedman S.L., (2003) Liver fibrosis – from bench to bedside *Journal of Hepatology* 38, S38–S53

G

Galle, M.B., DeFranco, R.M., Kerjaschki, D., Romanelli, R.G., Montalto, P., Gentilini, P. Pinzani, M., Romagnoli, P. (2001) Ordered array of dendritic cells and CD8+ lymphocytes in portal infiltrates in chronic hepatitis C. *Histopathology*, 39, 373-81.

Gamen, S., Hanson, D.A., Kaspar, A., Naval, J., Krensky, A.M., Anel, A., (1998). Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways. *J. Immunol.* 161, 1758–1764.

Gardner J. P., Durso R. J., Arrigale R. R., Donovan G. P., Maddon P. J., Dragic T. and Olson W. C. (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4498-503.

S. Gasser, S. Orsulic, E.J. Brown and D.H. Raulat, (2005) The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor, *Nature* 436 pp. 1186–1190.

Gati, A. *et al.* (2003). CD158 receptor controls cytotoxic T-lymphocyte susceptibility to tumor-mediated activation-induced cell death by interfering with Fas signaling. *Cancer Res.* 63, 7475–7482

Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Jung, M.C., Gruener, N.H., Schraut, W.W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C.A., Santantonio, T., and Pape, G.R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C *Gastroenterology*. 117:933-941.

Gerlach J. T., Ulsenheimer A., Grüner N. H., Jung M.-C., Schraut W., Schirren C.-A., Heeg M., Scholz S, Witter K., Zahn R., Vogler A, Zachoval R., Pape G. R. and Diepolder H.M. (2005) Minimal T-Cell-Stimulatory Sequences and Spectrum of HLA Restriction of Immunodominant CD4+ T-Cell Epitopes within Hepatitis C Virus NS3 and NS4 Proteins *Journal of Virology* Vol. 79, No. 19 , p. 12425–12433

Gimenez-Barcons, M. *et al.* (2005). The oncogenic potential of hepatitis C virus NS5A sequence variants is associated with PKR regulation. *J. Interferon Cytokine Res.* 25, 152–164

Godfrey D.I., Hammond K.J., Poulton L.D., Smyth M.J., Baxter A.G, (2000) NKT cells: facts, functions and fallacies, *Immunol. Today* 21 573– 583.

Goossens V et al (1999) Redox Regulation of TNF signalling. *Biofactors* 10, 145-156

- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., Moradpour, D., (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* 77 (9), 5487–5492.
- Grabowska A. M., Lechner F., Klenerman P., Tighe P. J., Ryder S., Ball J. K., Thomson B. J., Irving W. L. and Robins R. A. (2001) Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 31, 2388-94.
- Grakoui A., Shoukry N. H., Woollard D. J., Han J. H., Hanson H. L., Ghayeb J., Murthy K. K., Rice C. M. and Walker C. M. (2003) HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302, 659-62.
- Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol.*;67(3):1385-95.
- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. (1993) A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;90(22):10583-7.
- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. (1993) Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 67(5):2832-43.
- Gray JD, Hirokawa M, Horwitz DA. (1994) The role of transforming growth factor beta in the generation of suppression: an interaction between CD8+ T and NK cells. *J Exp Med.*;180(5):1937-42.
- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., Rowlands, D.J., (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535 (1–3), 34–38.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S. & Spies, T. (1998). Recognition of Stress-Induced MHC Molecules by Intestinal Epithelial gamma delta T Cells. *Science* 279, 1737–1740
- Groh, V. et al. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 6879–6884
- Groh, V. et al. (2001). Co-stimulation of CD8⁺ alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunol.* 2, 255-260
- Gruener, N.H., Gerlach, J.T., Jung, M.C., et al (2000). Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J.Infect.Dis.* 181:1528-1536.
- Gruener N. H., Lechner F., Jung M. C., Diepolder H., Gerlach T., Lauer G., Walker B., Sullivan J., Phillips R., Pape G. R. and Klenerman P. (2001) Sustained dysfunction of antiviral CD8⁺ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 75, 5550-8.
- Guerra, N. et al. (2002). Engagement of the inhibitory receptor CD158a interrupts TCR signaling, preventing dynamic membrane reorganization in CTL/tumor cell interaction. *Blood* 100, 2874–2881
- Guerra, N. et al. (2000). Killer inhibitory receptor (CD158b) modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas. *Blood* 95, 2883–2889
- Guidotti L. G. and Chisari F. V. (2001) Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19, 65-91.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (1996a). To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol.* 8:478-483.
- Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F.V. (1996b). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 4:25-36.

Gumperz, J. E., Valiante, N. M., Parham, P., Lanier, L. L. & Tyan, D. (1996). Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J. Exp. Med.* 183, 1817–1827

H

Hahn, W. C., Menu, E., Bothwell, A. L., Sims, P. J. and Bierer, B. E., (1992) Overlapping but nonidentical binding sites on CD2 for CD58 and a second ligand CD59. *Science*. 256: 1805–1807.

Han, J.Q., Barton, D.J., (2002). Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA* 8 (4), 512–525.

Hata K, Van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TL. (1991) Natural killer activity of human liver-derived lymphocytes in various liver diseases. *Hepatology*;14(3):495-503.

Hata, K., D. H. Van Thiel, et al. (1992). Phenotypic and functional characteristics of lymphocytes isolated from liver biopsy specimens from patients with active liver disease. *Hepatology* 15(5): 816-23.

Hardy KJ, Sawada T. (1989). Human γ -interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170:1021–6

Hart OM, Athie-Morales V, O'Connor GM, Gardiner CM. (2005) TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN- γ production. *J Immunol*; 175: 1636–420.

He X. S., Rehermann B., Lopez-Labrador F. X., Boisvert J., Cheung R., Mumm J., Wedemeyer H., Berenguer M., Wright T. L., Davis M. M. and Greenberg H. B. (1999) Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5692-7.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H et al. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*; 303:1526–9.

Heinzel, A. S. *et al.* (2002). HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 196, 1473–1481

Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* 16:216–29

Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* 16:230–39

Herzer, K., C. S. Falk, et al. (2003). Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J Virol* 77(15): 8299-309.

Hoffmann R. M., Diepolder H. M., Zchoval R., Zwiebel F. M., Jung M. C., Scholz S., Nitschko H., Riethmuller G. and Pape G. R. (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.

Holler N. et al (2000) Fas triggers an alternative, caspase 8 independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule *Nat Immunol* I, 489-495

Houghton M, Abrignani S. (2005) Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*. 436(7053):961-6.

Hsu, K. C. *et al.* (2002). Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J. Immunol.* 169, 5118–5129

Hsu, K. C., Chida, S., Geraghty, D. E. & Dupont, B. (2002). The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol. Rev.* 190, 40–52

Huard, B. & Karlsson, L. (2000). KIR expression on self-reactive CD8⁺ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* 403, 325–328

I

Inngjerdigen, M. *et al.* (2001) Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97, 367–375

Ishido S, Fujita T, Hotta H. (1998) Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.*;244(1):35-40.

Ishiyama, K., H. Ohdan, et al. (2006). Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology* 43(2): 362-72.

Iwai Y., Terawaki S., Ikegawa M., Okazaki T. and T Honjo. (2003) PD-1 inhibits antiviral Immunity at the effector phase in the liver. *J. Exp. Med.*, 198 39-50.

Iwasaki, A., Medzhitov, R., (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5 (10), 987–995.

J

Jinushi, M., T. Takehara, et al. (2004). Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173: 6072-81.

John B and Crispe I N (2004) Passive and Active Mechanisms Trap Activated CD8+ T Cells in the Liver *Journal of Immunology*, , 172: 5222–5229.

Joncas, J., Monczak, Y., Ghibu, F., Alfieri, C., Bonin, A., Ahronheim, G., and Rivard, G. (1989). Brief report: killer cell defect and persistent immunological abnormalities in two patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol.* 28:110-117.

K

Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell mediated cytotoxicity. *Science* 265:528–30

Kamal SM, Fehr J, Roesler B, Peters T, Rasenack JW. (2002). Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 123:1070–83

Kaneko T., Moriyama T., Udaka K., Hiroishi K., Kita H., Okamoto H., Yagita H., Okumura K. and Imawari M. (1997) Impaired induction of cytotoxic T lymphocytes by antagonism of a weak agonist borne by a variant hepatitis C virus epitope. *Eur J Immunol* 27, 1782-7.

Karadimitris A, Gadola S, Altamirano M, Brown D, Woolfson A, Klenerman P, Chen JL, Koezuka Y, Roberts IA, Price DA, Dusheiko G, Milstein C, Fersht A, Luzzatto L, Cerundolo V. (2002) Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;98(6):3294-8.

- Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., Vujanovic, N.L., (1999). Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J. Immunol.* 163, 5358–5366.
- Kaser, A., Enrich, B., Ludwiczek, O., Vogel, W., and Tilg, H. (1999). Interferon-alpha (IFN-alpha) enhances cytotoxicity in healthy volunteers and chronic hepatitis C infection mainly by the perforin pathway. *Clin Exp Immunol.* 118:71-77.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., Akira, S., (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23 (1), 19–28.
- Katz, J.D., Mitsuyasu, R., Gottlieb, M.S., Lebow, L.T., and Bonavida, B. (1987). Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. II. Normal antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by effector cells defective in natural killer (NK) cytotoxicity. *J Immunol.* 139:55-60.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., Akira, S., (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol* 6, 981–988.
- Kelly, J. M., N. J. Waterhouse, E. Cretney, K. A. Browne, S. Ellis, J. A. Trapani, M. J. Smyth. (2004). Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J. Biol. Chem.* 279: 22236-22242
- Kenna T, Golden-Mason L, Porcelli SA, Koezuka Y, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. (2003) NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol.*;171(4):1775-9.
- Kenna T, Golden-Mason L, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. (2004) Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol.*;113(1):56-63.
- Khabar, K. S. *et al.* (1997).The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha *J. Exp. Med.* 186, 1077–1085
- Khakoo, S. I., C. L. Thio, et al. (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305(5685): 872-4.
- Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. (1975). Natural killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* 5:117–21
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H. (1975). Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5:112–17
- Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. (1997) Towards defining a minimal functional domain for NTPase and RNA helicase activities of the hepatitis C virus NS3 protein. *Virus Res.*;49(1):17-25.
- Kimura, Y., T. Gushima, S. Rawale, P. Kaumaya, and C.M. Walker. (2005). Escape mutations alter proteasome processing of major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection. *J. Virol.*79:4870–4876.
- Kirm, A., Steffan, A.M., Bingen, A., Gendrault, J.L., and Cinqualbre, J. (1980). Uptake of viruses by Kupffer cells isolated from human liver. *Lancet.* 2:585-586.
- Kischkel FC. et al (1995) Cytotoxicity dependent Apo-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death inducing signalling complex (DISC) with the receptor *EMBO J* 14, 5579-5588

- Kischkel FC. et al (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase 10 and apoptosis initiation in the absence of caspase 8 *J Biol Chem* 276, 46639-46646
- Kittleson DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS.(2000) Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest.*;106(10):1239-49.
- Klein, J., and Sato, A. (2000a). The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 343:702-709.
- Klein, J., and Sato, A. (2000b). The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 343:782-786.
- Knolle, P.A., Uhrig, A., Hegenbarth, S., Loser, E., Schmitt, E., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1998). IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol.* 114:427-433.
- Knolle, P.A., Uhrig, A., Protzer, U., Trippler, M., Duchmann, R., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Gerken, G. (1998). Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology.* 27:93-99.
- Knolle P. A., Limmer A. (2001) Neighborhood politics: the Immunoregulatory function of organ resident Liver endothelial cells *Trends in Immunology* Vol.22 No.8
- Kojima, Y., Kawasaki-Koyanagi, A., Sueyoshi, N., Kanai, A., Yagita, H., Okumura, K., (2002). Localization of Fas ligand in cytoplasmic granules of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells: participation of Fas ligand in granule exocytosis model of cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 328.
- Konjevic, G. et al. (1995) Analysis of perforin expression in human peripheral blood lymphocytes, CD56+ natural-killer-cell subsets and its induction by interleukin-2. *Immunol.Invest.* 24, 499–507
- Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* 267:243-246.
- Koziel M. J., Dudley D., Afdhal N., Grakoui A., Rice C. M., Choo Q. L., Houghton M. and Walker B. D. (1995) HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J Clin Invest* 96, 2311-21.
- Koziel M. J., Dudley D., Wong J. T., Dienstag J., Houghton M., Ralston R. and Walker B. D. (1992) Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 149, 3339-44.
- Koziel M. J., Dudley D., Afdhal N., Choo Q. L., Houghton M., Ralston R. and Walker B. D. (1993) Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol* 67, 7522-32.
- Koziel, M.J., Dudley, D., Afdhal, N., Grakoui, A., Rice, C.M., Choo, Q.L., Houghton, M., and Walker, B.D. (1995). HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J.Clin.Invest.* 96:2311-2321
- Kraft, J. R. et al. (2000). Analysis of Qa-1(b) peptide binding specificity and the capacity of CD94/NKG2A to discriminate between Qa-1-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 192, 613–624
- Kubo, M., Hanada, T., Yoshimura, A., (2003). Suppressors of cytokine signalling and immunity. *Nat. Immunol.* 4 (12), 1169–1176.
- Kunikata, T. et al. (1998) Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral-blood-cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* 189, 135–143

Kutteh, W.H., Rainey, W.E., and Carr, B.R. (1991). Regulation of interleukin-6 production in human fetal Kupffer cells. *Scand J Immunol.* 33:607-613.

L

Lai, M.E., Mazzoleni, A.P., Argioli, F., De Virgilis, S., Balestrieri, A., Purcell, R.H., Cao, A., Farci, P., (1994). Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* 343 (8894), 388–390.

Lai W K., Sun P J., Zhang J, Jennings A, Lalor P F., Hubscher S, McKeating J A., and Adams D H. (2006) Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on Human Sinusoidal Endothelium *American Journal of Pathology*, Vol. 169, No. 1,

Lanier, L.L. (2001) On guard-activating NK cell receptors. *Nat. Immunol.* 2, 23–27

Lanier LL. (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.

Lantz, O., and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med.* 180:1097-1106.

Lanzavecchia, A. (1996). Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol.* 8:348-354.

Lauer G. M., Ouchi K., Chung R. T., Nguyen T. N., Day C. L., Purkis D. R., Reiser M., Kim A. Y., Lucas M., Klenerman P. and Walker B. D. (2002) Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 76, 6104-13.

Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, Donot P, Soulier A, Pakalos E, Sakellariou G, Intrator L, Bartosch B, Pawlotsky JM and Cosset FL. (2005). Human serum facilitates hepatitis C virus infection and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol* 79: 6023-34.

Lechner, F. *et al.* (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* 191, 1499–1512

Lechner, F., Gruener, N.H., Urbani, S., Uggeri, J., Santantonio, T., Kammer, A.R., Cerny, A., Phillips, R., Ferrari, C., Pape, G.R., and Klenerman, P. (2000a). CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol.* 30:2479-2487.

Le Drean, E., F. Vely, et al. (1998). Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 28(1): 264-76.

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(1):271-9.

Leibson, P.J. (1997) Signal transduction during natural-killer-cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 6, 655–661

Lerat, H., Rumin, S., Habersetzer, F., Berby, F., Trabaud, M.A., Trepo, C., and 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.* 91:3841-3849.

Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, Marche PN, et al. (2003) Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 38:829-841.

- Levy, D.E., Darnell Jr., J.E., (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (9), 651–662.
- Li, Y., Zhang, T., Ho, C., Orange, J. S., Douglas, S. D., Ho, W. Z. (2004) Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression. *J Leukoc Biol.*, 76, 1171-9.
- Li L.Y., Luo X., Wang X., (2001) Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature* 412 95-99
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale Jr., M., Lemon, S.M., (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (8), 2992–2997.
- Lin, A. W., S. A. Gonzalez, et al. (2004). CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 137(2): 408-16.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., Rice, C.M., (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309 (5734), 623–626.
- Lieberman (2003) The ABCs of granule mediated cytotoxicity : new weapons in the arsenal *Nature Reviews Immunology* vol 3 pp361
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., Rice, C.M., (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309 (5734), 623–626.
- Lirussi, F., A. Beccarello, et al. (2002). Impaired Natural Killer cell cytotoxic activity in chronic hepatitis C viral infection: a single center, controlled study. *Current Therapeutic Research* 63(11): 748-58.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R., (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285 (5424), 110–113
- Lohwasser, S., Kubota, A., Salcedo, M., Lian, R. H. & Takei, F. (2001). The non-classical MHC class I molecule Qa-1(b) inhibits classical MHC class I-restricted cytotoxicity of cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 13, 321–327
- Longman R. S., Talal A. H., Jacobson I. M., Albert M. L. and Rice C. M. (2004) Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 103, 1026-9.
- Lopez-Vasquez A., Rodrigo L., Martinez-Borra J., Perez R., Rodriguez M., Fdez-Morera J.L., Fuentes D., Rodriguez-Rodero S., Gonzales S. and C. Lopez-Larrea. (2005) Protective effect of the HLA-Bw4180 epitope and the KIR3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.*, 192, 162-165.
- Lozach P. Y., Lortat-Jacob H., de Lacroix de Lavalette A., Staropoli I., Fong S., Amara A., Houles C., Fieschi F., Schwartz O., Virelizier J. L., Arenzana-Seisdedos F. and Altmeyer R. (2003) DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278, 20358-66.
- Hongxia Lu, Qiang Hou, Tongbiao Zhao, Honglian Zhang, Qixiang Zhang, Lianfeng Wu, and Zusen Fan (2006) Granzyme M Directly Cleaves Inhibitor of Caspase-Activated DNase (CAD) to Unleash CAD Leading to DNA Fragmentation *J Immunol*; 177 1171-1178
- Lucas M., Gadola S, Meier U, Young N.T., Harcourt G., Karadimitris A., Coumi N., Brown D., Dusheiko G., Cerundolo V., Klenerman P, (2003) Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection, *J. Virol.* 77, 2251– 2257.

Lucas M., Vargas-Cuero A. L., Lauer G. M., Barnes E., Willberg C. B., Semmo N., Walker B. D., Phillips R. and Klenerman P. (2004) Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8⁺ T cells. *J Immunol* 172, 1744-53.

Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:5598–603.

Luszczek W., Manczak M. Cislo M., Nockowski P., Wisniewski A., Jasek M. and P. Kusnierczyk. (2004) Gene for the activating natural killer cell receptor KIR2DS1 is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Human Immunol.*, 65, 758-766.

M

Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 154:5071-5079.

MacDonald G, Shi L, Vande Velde C, Lieberman J, Greenberg AH.(1999) Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *J Exp Med.* ;189(1):131-44.

Maggi, E., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Annunziato, F., Manetti, R., Piccinni, M.P., Parronchi, P., Sampognaro, S., Giannarini, L., Zuccati, G., and et al. (1994). Th2-like CD8⁺ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Exp Med.* 180:489-495.

Maher, J.K., and Kronenberg, M. (1997). The role of CD1 molecules in immune responses to infection. *Curr Opin Immunol.* 9:456-461.

Maini, M.K., Reignat, S., Boni, C., Ogg, G.S., King, A.S., Malacarne, F., Webster, G.J., and Bertoletti, A. (2000). T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection. *Eur J Immunol.* 30:3067-3078.

McMahon, C. W., A. J. Zajac, et al. (2002). Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells. *J Immunol* 169(3): 1444-52.

Malissen, B., and Schmitt-Verhulst, A.M. (1993). Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. *Curr Opin Immunol.* 5:324-333.

Malmberg, K. J. et al. (2002). IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 110, 1515–1523

Mandelboim O., Lieberman N., Lev M., Paul L., Arnon T.I., Bushkin Y., Davis D.M., Strominger J.L., Yewdell J.W and Porgador A., (2001), Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells, *Nature* 409 pp. 1055–1060.

Marcenaro E., Augugliaro R., Falco M, Castriconi R., Parolini S., Sivori S., Romeo E., Millo R., Moretta L, Bottino C. and Moretta A. (2003) CD59 is physically and functionally associated with natural cytotoxicity receptors and activates human NK cell-mediated cytotoxicity *Eur. J. Immunol.* 33: 3367–3376

Markiewski MM, DeAngelis RA, Lambris JD. (2006) Liver inflammation and regeneration: two distinct biological phenomena or parallel pathophysiological processes? *Mol Immunol.*;43(1-2):45-56.

Marra, F. (1999). Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J. Hepatol.* 31:1120–1130.

Marsh, S. G. E. et al. (2003). Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics* 55, 220–226

- Marti, F. *et al.* (1998). LCK-phosphorylated human killer cell-inhibitory receptors recruit and activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 11810–11815
- Martin, M. P. *et al.* (2002). Epistatic interaction between *KIR3DS1* and *HLA-B* delays the progression to AIDS. *Nature Genet.* 31, 429–434
- Martin, A. M., Kulski, J. K., Witt, C., Pontarotti, P. & Christiansen, F. T. (2002). Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Trends Immunol.* 23, 81–88
- Matos, M.E. *et al.* (1993) Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J. Exp. Med.* 178, 1079–1084
- Mavilio D., Lombardo G., Benjamin J., Follman D., Marcenaro E., O’Shea M.A., Kinter A., Kovacs C., Moreta A. and A. Fauci. (2005) Characterisation of CD56-CD16+ natural killer cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *PNAS USA*, 102, 2886-2891.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.*;1(2):135-45.
- Mehal W. Z., Juedes A. E. and Crispe I. N. (1999) Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* 163, 3202-10.
- Meier, U. C., Owen R. E., et al. (2005). Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J Virol* 79(19): 12365-74.
- Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, Trapani JA, Froelich CJ: (2002) Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16:417-428.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., Tschopp, J., (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172.
- Michaelsson, J. *et al.* (2002). A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J. Exp. Med.* 196, 1403–1414
- Michalak I, Lau JY, McFarlane BM, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. (1995) Antibody-directed complement-mediated cytotoxicity to hepatocytes from patients with chronic hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 100 227-32.
- Miller, J. D., M. Peters, et al. (2002). CD94/NKG2 expression does not inhibit cytotoxic function of lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 169(2): 693-701.
- Mingari, M. C. *et al.* (1998). HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin-15 induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8⁺ T cells. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 95, 1172–1177
- Mingari, M. C. *et al.* (1995). Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int. Immunol.* 7, 697–703
- Mingari, M. C., F. Schiavetti, et al. (1996). Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12433-8.
- Mingari, M. C., M. Ponte, et al. (1997). HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells. *Int Immunol* 9(4): 485-91.

- Mingari, M. C., G. Pietra, et al. (2005). Human cytolytic T lymphocytes expressing HLA class-I-specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 17(3): 312-9.
- Minutello M. A., Pileri P., Unutmaz D., Censini S., Kuo G., Houghton M., Brunetto M. R., Bonino F. and Abrignani S. (1993) Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* 178, 17-25.
- Missale G., Bertoni R., Lamonaca V., Valli A., Massari M., Mori C., Rumi M. G., Houghton M., Fiaccadori F. and Ferrari C. (1996) Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 98, 706-14.
- Mondelli M. (2003) Multifaceted functions of B cells in chronic hepatitis C virus infection *Antiviral Research* 60, 111–115
- Montel, A.H., Bochan, M.R., Hobbs, J.A., Lynch, D.H., Brahmi, Z., (1995). Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell. Immunol.* 166, 236–246.
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C. and Moretta, L., (2000) Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 21: 228-234
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. and Moretta, L., (2001) Activating receptors and co-receptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 197-223
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M.C., and Moretta, L. (1996). Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 14:619-648.
- Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature Rev. Immunol.* 2, 957–964
- Moretta, L., Romagnani, C., Pietra, G., Moretta, A., Mingari, M. C. (2003) NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset. *Trends Immunol.* 24, 136-43.
- Morris M.A., Ley K., (2004) Trafficking of natural killer cells, *Curr. Mol. Med* 4 431– 438.
- Mosnier JF, Degott C, Marcellin P, Henin D, Erlinger S, Benhamou JP. (1993) The intraportal lymphoid nodule and its environment in chronic active hepatitis C: an immunohistochemical study. *Hepatology.* ;17(3):366-71.
- Moser, J. M., J. Gibbs, et al. (2002). CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses. *Nat Immunol* 3(2): 189-95.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7:145-173.
- Mrozek, E. et al. (1996) Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 2632–2640
- Muhlbauer M., Fleck M., Schutz C., Weiss T., Froh M., Blank C., Scholmerich J. and C. Hellerbrand. (2006) PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *Journal of Hepatology*, publication en ligne.
- Muller, H.M., Pfaff, E., Goeser, T., Kallinowski, B., Solbach, C., and Theilmann, L. (1993). Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol.* 74:669-676.

N

- Naderi, S., Hofmann, P., Seiter, S., Tilgen, W., Abken, H. and Reinhold, U., (1999) CD2-mediated CD59 stimulation in keratinocytes results in secretion of IL-1 alpha, IL-6, and GM-CSF: implications for the interaction of keratinocytes with intraepidermal T lymphocytes. *Int. J. Mol. Med.* 3: 609–614.
- Nagasaka, A., Hige, S., Tsunematsu, I., Yoshida, J., Sasaki, Y., Matsushima, T., and Asaka, M. (1996). Changes in hepatitis C virus quasispecies and density populations in patients before and after interferon therapy. *J Med Virol.* 50:214-220.
- Nagler, A. *et al.* (1990) Constitutive expression of high-affinity interleukin-2 receptors on human CD16 negative natural killer cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 171, 1527–1533
- Nagler, A. *et al.* (1989) Comparative studies of human FcRIII-positive and -negative natural killer cells. *J. Immunol.* 143, 3183–3191
- Nakajima H, Cella M, Langen H, Friedlein A, Colonna M. (1999). Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur. J. Immunol.* 29:1676–83
- Nattermann, J., H. D. Nischalke, et al. (2005). The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 166(2): 443-53.
- Navas, S., Martin, J., Quiroga, J.A., Castillo, I., and 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. *J.Virol.* 72:1640-1646.
- Nelson D. R., Marousis C. G., Davis G. L., Rice C. M., Wong J., Houghton M. and Lau J. Y. (1997) The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol* 158, 1473-81.
- Neumann-Haefelin C., Blum H. E., Chisari F. V. and Thimme R. (2005) T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 32, 75-85.
- Neumann A. U., Lam N. P., Dahari H., Gretch D. R., Wiley T. E., Layden T. J. and Perelson A. S. (1998) Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282, 103-7.
- Ni, J., Hembrador, F., Di Bisceglie, A.M., Jacobson, I.M., Talal, A.H., Butera, D., Rice, C.M., Chambers, T.J., Dustin, L.B., (2003). Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J. Immunol.* 170, 3429–3439.
- Noguchi, T. *et al.* (2001). Effects of mutation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A on interferon resistance mediated by inhibition of PKR kinase activity in mammalian cells. *Microbiol. Immunol.* 45, 829–840
- Norris S., Collins C., Doherty D. G., Smith F., McEntee G., Traynor O., Nolan N., Hegarty J. and O'Farrelly C. (1998) Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 28, 84-90.
- Norris S., Doherty D. G., Collins C., McEntee G., Traynor O., Hegarty J. E. and O'Farrelly C. (1999) Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogenous and include Valpha24-JalphaQ and gammadelta T cell receptor bearing cells. *Hum Immunol* 60, 20-31.
- Norris, S., C. Collins, et al. (1998). Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 28(1): 84-90.
- Nuti, S., Rosa, D., Valiante, N.M., Saletti, G., Caratozzolo, M., Dellabona, P., Barnaba, V., and Abrignani, S. (1998). Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 28:3448-3455.

O

O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 8:275-283.

Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P.R., Nowak, M.A., Monard, S., Segal, J.P., Cao, Y., Rowland-Jones, S.L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D.D., Nixon, D.F., and McMichael, A.J. (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 279:2103-2106.

Ohashi, P.S., Mak, T.W., Van den Elsen, P., Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Calman, A.F., Terhorst, C., Stobo, J.D., and Weiss, A. (1985). Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. *Nature*. 316:606-609.

Op De Beeck, A., Cocquerel, L. & Dubuisson, J. (2001). Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 82, 2589–2595.

Orange J.S., Ballas Z. K., (2006) Natural killer cells in human health and disease *Clinical Immunology* 118 ; 1 – 10

Orange, J.S., and Biron, C.A. (1996). An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol*. 156:1138-1142.

Ortaldo, J. R., S. O. Sharrow, et al. (1981). "Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies." *J Immunol* 127(6): 2401-9.

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 (5), 1004–1012.

P

Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 16:323-358.

Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 5(3): 201-14.

Parolini S, Bottino C, Falco M, Augugliaro R, Giliani S, Franceschini R, Ochs HD, Wolf H, Bonnefoy JY, Biassoni R, Moretta L, Notarangelo LD, Moretta A (2000) X-linked lymphoproliferative disease: 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of NK cell to kill EBV infected cells. *J Exp Med* 192: 337–346

Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., Zitzmann, N., (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), 6104–6108.

Pawlotsky, J.M., Germanidis, G., Frainais, P.O., Bouvier, M., Soulier, A., Pellerin, M., and Dhumeaux, D. (1999). Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J Virol*. 73:6490-6499.

Pawlotsky J-M., Dhumeaux D., (2004) Hépatite C. Editions EDK, Paris.

Penna A, Missale G, Lamonaca V, Pilli M, Mori C, Zanelli P, Cavalli A, Elia G, Ferrari C. (2002) Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*.;35(5):1225-36.

- Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. (1999) Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med.*;190: 1505-1516.
- Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. (1998) Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol.*;161(11):5821-4.
- Pernollet M, Jouvin-Marche E, Leroy V, Vigan I, Zarski JP, Marche PN. (2002) Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions. *Clin Exp Immunol* 130:518-525.
- Perrin, G. *et al.* (2002). Sister cytotoxic CD8⁺ T cell clones differing in natural killer inhibitory receptor expression in human astrocytoma. *Immunol. Lett.* 81, 125–132
- Perussia B., Chen Y., Loza M.J., (2005) Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell, *Mol. Immunol.* 42 ; 385– 395.
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., Moretta, A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 188:953-960
- Peters P.J. et al (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes containing both perforin and granzymes *J Exp Med* 173, 1099-1109
- Pietra, G. *et al.* (2003). HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 10896–10901
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282(5390): 938-41.
- Pisegna S, Pirozzi G, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Palmieri G. (2004) p38MAPK activation controls the TLR3-mediated upregulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood*; 104:4157–64.
- Podack ER, Young JD, Cohn ZA. (1985). Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8629–33
- Pohlmann S., Zhang J., Baribaud F., Chen Z., Leslie G. J., Lin G., Granelli-Piperno A., Doms R. W., Rice C. M. and McKeating J. A. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77, 4070-80.
- Polyak, S. J. *et al.* (2001). Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* 75, 6095–6106
- Polyak, S.J., McArdle, S., Liu, S.L., Sullivan, D.G., Chung, M., Hofgartner, W.T., Carithers, R.L., McMahon, B.J., Mullins, J.I., Corey, L., and Gretch, D.R. (1998). Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity determining region during interferon therapy and natural infection. *J Virol.* 72:4288-4296.
- Porcelli, S., Morita, C.T., and Brenner, M.B. (1992). CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature.* 360:593-597.
- Porcelli, S.A. (1995). The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv Immunol.* 59:1-98.
- Porcelli, S., Gerdes, D., Fertig, A.M., and Balk, S.P. (1996). Human T cells expressing an invariant V alpha 24-J alpha Q TCR alpha are CD4- and heterogeneous with respect to TCR beta expression. *Hum Immunol.* 48:63-67.

Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, et al., (2004) Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis* 189 1846-55.

Poynard, T., S. Naveau, M. Doffoel, K. Boudjema, C. Vanlemmens, G. Manton, M. Messner, B. Launois, D. Samuel, D. Cherqui, G. Pageaux, P.H. Bernard, Y. Calmus, J.P. Zarski, J.P. Miguet, and J.C. Chaput. (1999). Evaluation of efficacy of liver transplantation in alcoholic cirrhosis using matched and simulated controls: 5-year survival. Multi-centre group. *J Hepatol.* 30:1130-7.

Pruvot FR, Navarro F, Janin A, Labalette M, Masy E, Lecomte-Houcke M, Gambiez L, Copin MC, Dessaint JP. (1995) Characterization, quantification, and localization of passenger T lymphocytes and NK cells in human liver before transplantation. *Transpl Int.*;8(4):273-9.

Q

Quinnan, G.V., Jr., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G.W., Saral, R., and Burns, W.H. (1982). Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T- lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med.* 307:7-13.

R

Racanelli V, Rehermann B. (2003) Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 24:456-464.

Raja SM, Wang B, Dantuluri M, Desai UR, Demeler B, Spiegel K, Metkar SS, Froelich CJ: (2002) Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem*, 277:49523-49530.

Ramadori G and Saile B. (2004). Portal tract fibrogenesis in the liver. *Laboratory Investigation* 84, 153–159

Ramsden, D.A., Paull, T.T., and Gellert, M. (1997a). Cell-free V(D)J recombination. *Nature.* 388:488-491.

Raulet D. (2003) Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands *Nat Rev Immunol* Vol 3 p781-790

Ray, S.C., L. Fanning, X.-H. Wang, D.M. Netski, E. Kenny-Walsh, and D.L. Thomas. (2005) Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* 201:1753–1759.

Reed KE, Rice CM. (2000). Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 242:55–84

Rehermann B and Nascimbeni M (2005) Immunology of Hepatitis B virus and Hepatitis C virus infection *Nat Rev Immunol* Vol 5 p215-229

Rehermann B, Chang KM, McHutchinson J, et al. (1996) Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol*; 70:7092-102.

Robertson, M.J. et al. (1990) Human natural killer-cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J. Immunol.* 145, 3194–3201

Robertson, M.J. et al. (1992) Response of human natural killer (NK) cells to NK-cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med.* 175, 779–788

Robertson, M.J. et al. (1993) Costimulatory signals are required for optimal proliferation of human natural killer cells. *J. Immunol.* 150, 1705–1714

- Robertson, M. J. and J. Ritz (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76(12): 2421-38.
- Robbins, S. H., Terrizzi, S. C., Sydora, B. C., Mikayama, T. & Brossay, L. (2003) Differential regulation of killer cell lectin-like receptor G1 expression on T cells. *J. Immunol.* 170, 5876–5885
- Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol.* 17:739-779.
- Rollier C., Drexhage J. A., Verstrepen B. E., Verschoor E. J., Bontrop R. E., Koopman G. and Heeney J. L. (2003) Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* 38, 851-8.
- Rosa D, Saletti G, De Gregorio E, Zorat F, Comar C, D'Oro U, Nuti S, Houghton M, Barnaba V, Pozzato G, and Abrignani S (2005) Activation of naïve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders *PNAS* 102 (51):18544-18549
- Rosen, H. R., C. Miner, et al. (2002). Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology* 35(1): 190-8.
- Rosenberg EB, McCoy JL, Green SS, Donnelly FC, Siwarski DF, et al. (1974). Destruction of human lymphoid tissue-culture cell lines by human peripheral lymphocytes in 51Cr-release cellular cytotoxicity assays. *J. Natl. Cancer Inst.* 52:345–52
- Rowell, D.L., Eckmann, L., Dwinell, M.B., Carpenter, S.P., Raucy, J.L., Yang, S.K., and Kagnoff, M.F. (1997). Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion. *Am J Physiol.* 273:G322-332.
- Rubin RA, Falestiny M and Malet PF. (1994) Chronic hepatitis C: advances in diagnostic testing and therapy. *Arch Intern Med* 154: 387-92.
- Russell J H. and Ley T J. (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity *Annu. Rev. Immunol.* 20:323–70
- S**
- Salgame, P., Abrams, J.S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R.L., and Bloom, B.R. (1991). Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 254:279-282.
- Samelson, L.E., O'Shea, J.J., Luong, H., Ross, P., Urdahl, K.B., Klausner, R.D., and Bluestone, J. (1987). T cell antigen receptor phosphorylation induced by an anti-receptor antibody. *J Immunol.* 139:2708-2714.
- Samuel C.E., (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (4), 778–809.
- Sarobe P., Lasarte J. J., Casares N., Lopez-Diaz de Cerio A., Baixeras E., Labarga P., Garcia N., Borrás-Cuesta F. and Prieto J. (2002) Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* 76, 5062-70.
- Sayers et al (2001) The restricted expression of Granzyme M in human lymphocytes *J Immunol* 166, 765-771
- Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R. M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R. and Vitelli A. (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21, 5017-25.
- Schafer, S.L., Lin, R., Moore, P.A., Hiscott, J., Pitha, P.M., (1998). Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J.Biol. Chem.* 273 (5), 2714–2720.

- Sciammas, R., Johnson, R.M., Sperling, A.I., Brady, W., Linsley, P.S., Spear, P.G., Fitch, F.W., and Bluestone, J.A. (1994). Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. *J Immunol.* 152:5392-5397.
- Shilling, H. G., Young, N., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Tyan, D., Parham, P. 2002. Genetic control of human NK cell repertoire. *J. Immunol.*, 169, 239-47.
- Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T et al., (1996) A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell culture. *Virology* 223: 409-12.
- Schirren C. A., Jung M. C., Gerlach J. T., Worzfeld T., Baretton G., Mamin M., Hubert Gruener N., Houghton M. and Pape G. R. (2000) Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma. *Hepatology* 32, 597-603.
- Schmidt KN, Leung B, Kwong M, Zarembek KA, Satyal S, NavasTA, Wang F, Godowski PJ. (2004) APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol*; 172:138–43.
- Schroder K, Hertzog P J, Ravasi T, and Hume D A (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-189.
- Scoazec, J.Y., and Feldmann, G. (1990). Both macrophages and endothelial cells of the human hepatic sinusoid express the CD4 molecule, a receptor for the human immunodeficiency virus. *Hepatology.* 12:505-510.
- Sedelies KA, Sayers TJ, Edwards KM, Chen W, Pellicci DG, Godfrey DI, Trapani JA. (2004) Discordant regulation of granzyme H and granzyme B expression in human lymphocytes. *J Biol Chem.*; 279(25):26581-7.
- Sedlmayr, P. *et al.* (1996) Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural-killer-cell subpopulations. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110, 308–313
- Seifert, U., H. Liermann, V. Racanelli, A. Halenius, M. Wiese, H. Wedemeyer, T. Ruppert, K. Rispeter, P. Henklein, A. Sijts, et al. (2004). Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J. Clin. Invest.* 114:250–259.
- Shibuya A, Campbell D, Hannum C, et al. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* 4: 573-581
- Shilling, H. G. *et al.* (2002). Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J. Immunol.* 168, 2307–2315
- Shizuo Akira, Satoshi Uematsu and Osamu Takeuchi (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity *Cell*, Volume 124, Issue 4, 783-801
- Shoukry N H., Cawthon A G, and Walker C M. (2004) Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection *Annu. Rev. Microbiol.* 58:391–424
- Shoukry N. H., Grakoui A., Houghton M., Chien D. Y., Ghrayeb J., Reimann K. A. and Walker C. M. (2003) Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197, 1645-55.
- Shuai, K., Liu, B., (2005). Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 5 (8), 593–605.
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, et al. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.* 74:2391–99

- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med.* 186:1129-1136
- Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A., (2000) 2B4 functions as a coreceptor in human natural killer cell activation. *Eur. J. Immunol.* 30: 787-793.
- Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, Moretta A. (2004) CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:10116-21.
- Snyder, M. R. *et al.* (2002) Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4⁺CD28⁻ T cells. *J. Immunol.* 168, 3839-3846
- Sobao, Y., Tomiyama, H., Nakamura, S., Sekihara, H., Tanaka, K., and Takiguchi, M. (2001). Visual demonstration of hepatitis C virus-specific memory CD8(+) T-cell expansion in patients with acute hepatitis C. *Hepatology.* 33:287-294.
- Solomon, K.R. *et al.* (1995) Expression of GPIanchored complement regulatory proteins CD55 and CD59 differentiates two subpopulations of human CD56+CD3- lymphocytes (NK cells). *Cell.Immunol.* 165, 294-301
- Speiser, D. E., M. J. Pittet, *et al.* (1999). In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 190(6): 775-82.
- Speiser, D. E., D. Valmori, *et al.* (1999). CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur J Immunol* 29(6): 1990-9.
- Su A. I., Pezacki J. P., Wodicka L., Brideau A. D., Supekova L., Thimme R., Wieland S., Bukh J., Purcell R. H., Schultz P. G. and Chisari F. V. (2002) Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15669-74.
- Sugimoto K., Ikeda F., Stadanlick J., Nunes F. A., Alter H. J. and Chang K. M. (2003) Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 38, 1437-48.
- Sutherland CL, Chalupny NJ, Cosman D (2001) The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunol Rev* 181: 185-192
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.*;42(4):501-10.
- Starzl, T.E., Murase, N., Thomson, A., and Demetris, A.J. (1996). Liver transplants contribute to their own success. *Nat Med.* 2:163-165
- Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., *et al.*, (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282, 121-125.

T

- Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Kadoya, H., Ohgimoto, S., Ishido, S., Hotta, H., (2004). Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'- oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt4), 959-969.

- Takaki, A., M. Wiese, et al. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6(5): 578-82.
- Tanaka, Y., Morita, C.T., Nieves, E., Brenner, M.B., and Bloom, B.R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*. 375:155-158.
- Tangye SG, Phillips JH, Lanier LL, Nichols KE. (2000) Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol.*;165(6):2932-6.
- Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 836-847
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. & Lai, M. M. C. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285, 107–110
- Tester, I., S. Smyk-Pearson, P. Wang, A. Wertheimer, E. Yao, D.M. Lewinsohn, J.E. Tavis, and H.R. Rosen. (2005) Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J. Exp. Med.* 201:1725–1731.
- Thimme R., Lohmann V., Weber F. (2006) A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Research* 69 , 129–141
- Thimme R., Bukh J., Spangenberg H. C., Wieland S., Pemberton J., Steiger C., Govindarajan S., Purcell R. H. and Chisari F. V. (2002) Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15661-8.
- Thimme, R. *et al.* (2001) Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J. Exp.Med.* 194, 1395–1406.
- Thio C.L., Gao X., Goedert J.J., Vlahov D., Nelson K.E., Hilgartner M.W., O'Brien, S.J., Karacki P., Astemborski J., Carrington M. and D.L. Thomas. (2002) HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *J. Virol.*, 76, 4792-4797.
- Thomas D.A., Du C., Xu M., Wang X., Ley T.J. (2000) DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis *Immunity* 12, 621-632
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Kochel, H. G. & Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 181, 293–300.
- Timm, J., G.M. Lauer, D.G. Kavanagh, I. Sheridan, A.Y. Kim, M. Lucas, T. Pillay, K. Ouchi, L.L. Reyor, J.S. Zur Wiesch, et al. (2004). CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J. Exp. Med.* 200: 1593–1604.
- Tomasec, P. *et al.* (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287, 1031.
- Trambas C.M. Griffiths G.M. (2003) Delivering the kiss of death *Nature Immunology* Vol 4 no 5 : 400-403
- Trinchieri, G., (1989). Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47, 187–376.
- Trinchieri G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:251–76
- Tsai S. L., Chen Y. M., Chen M. H., Huang C. Y., Sheen I. S., Yeh C. T., Huang J. H., Kuo G. C. and Liaw Y. F. (1998) Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 115, 954-65.

Tsai, S.L., Liaw, Y.F., Chen, M.H., Huang, C.Y., and Kuo, G.C. (1997). Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology*. 25:449-458.

Tseng C, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel G.R. (2001) Characterization of Liver T-Cell Receptor gamma delta+ T Cells Obtained From Individuals Chronically Infected With Hepatitis C Virus (HCV): Evidence for These T Cells Playing a Role in the Liver Pathology Associated With HCV Infections *Hepatology* Vol. 33, No. 5

Tseng, C. T. and G. R. Klimpel (2002). Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 195(1): 43-9.

Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A., (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 66 (3), 1476–1483.

U

Ulbrecht, M. *et al.* (2000). Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J. Immunol.* 164, 5019–5022

Urbani S., Boni C., Missale G., Elia G., Cavallo C., Massari M., Raimondo G. and Ferrari C. (2002) Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 76, 12423-34.

Uhrberg, M., N. M. Valiante, *et al.* (2001). The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol* 166(6): 3923-32

Uhrberg, M., Parham, P. & Wernet, P. (2002). Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: *KIR* haplotypes contain between seven and eleven genes. *Immunogenetics* 54, 221–229

Uhrberg, M., N. M. Valiante, *et al.* (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7(6): 753-63.

Ulrichs, T., and Porcelli, S.A. (2000). CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet.* 2:416-432.

V

Vales-Gomez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A., Lopez-Botet, M. & Strominger, J. L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J.* 18, 4250–4260

van Baarle D, Kostense S, van Oers MH, Hamann D, Miedema F. (2002) Failing immune control as a result of impaired CD8+ T-cell maturation: CD27 might provide a clue. *Trends Immunol* 23:586-591.

Van Beneden, K. *et al.* (2002). Expression of inhibitory receptors Ly49E and CD94/NKG2 on fetal thymic and adult epidermal TCR Vgamma3 lymphocytes. *J. Immunol.* 168, 3295–3302

van der Vliet H.J., Molling J.W., von Blomberg B.M., Nishi N., Kflgen W., van den Eertwegh A.J., Pinedo H.M., Giaccone G., Scheper R.J., (2004) The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease, *Clin. Immunol.* 112 8 –23.

van der Vliet H J., Molling J W. *et al* (2005) Circulating Va24+Vh11+ NKT cell numbers and dendritic cell CD1d expression in hepatitis C virus infected patients. *Clinical Immunology* 114, 183–189

Van Thiel DH, Zhang X, Baddour N, Wright HI, FriedlanderL, Gavalier JS. (1994) Intrahepatic mononuclear cell populations and MHC antigen expression in patients with chronic hepatitis C [correction of B]: effect of interferonalpha. *Dig Dis Sci*;39:970-976.

- Vely, F. *et al.* (2001). Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements. *J. Immunol.* 166, 2487–2494
- Vely, F., Olcese, L., Blery, M., and Vivier, E. (1996). Function of killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules. *Immunol Lett.* 54:145-150.
- Vercammen D *et al* (1998) Dual signalling of the Fas receptor : initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 188, 919-930
- Vieira, P.L., de Jong, E.C., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L., and Kalinski, P. (2000). Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol.* 164:4507-4512.
- Vigan, I., Jouvin-Marche, E., Leroy, V., Pernollet, M., Tongiani-Dashan, S., Borel, E. Delachanal, E., Colomb, M., Zarski, J. P., Marche, P. N. (2003) T lymphocytes infiltrating the liver during chronic hepatitis C infection express a broad range of T-cell receptor beta chain diversity. *J. Hepathol.*, 38, 651-9.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, R., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells is involved in non-MHC restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 187:2065-2072
- Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A., (2001) Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.*. 31: 233–242.
- Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, Moretta A. (2005) NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood.*;106(2):566-71
- Vivier, E. and N. Anfossi (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol* 4(3): 190-8.
- Voehringer, D. *et al.* (2001). Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 167, 4838–4843
- Voehringer, D., Koschella, M. & Pircher, H. (2002). Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Blood* 100, 3698–3702
- Voss, S.D. *et al.* (1998) Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J. Immunol.* 160, 1618–1626
- Vukmanovic-Stejic, M., Vyas, B., Gorak-Stolinska, P., Noble, A., and Kemeny, D.M. (2000). Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood.* 95:231-240.
- Vyas, J., Elia, A., Clemens, M.J., (2003). Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. *RNA* 9 (7), 858–870.

W

- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T.J., (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11 (7), 791–796.
- Wang, K.S. *et al.* (2000) Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* 95, 3183–3190

- Ward, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P (2002) Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002 *Clin Exp Immunol*; 128:195–203
- Warren HS, Kinnear BF, Phillips JH, Lanier LL. (1995) Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol.* ;154(10):5144-52.
- Weber, F., Kochs, G., Haller, O., (2004). Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol.* 17 (4), 498–515.
- Wedemeyer, H. *et al.* (2002). Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 169, 3447–3458
- Weiner, A., A.L. Erickson, J. Kansopon, K. Crawford, E. Muchmore, A.L. Hughes, M. Houghton, and C.M. Walker. (1995). Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 92:2755–2759.
- Weiss, A. (1993). T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell.* 73:209-212.
- Welte, S. A. *et al.* (2003). Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* 33, 194-203
- Wheelock EF. (1965). Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149:310–11
- Wilson, M. J. *et al.* (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 4778–4783
- Wilson M *et al.*, (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97. 4778-83.
- Wisse E, van't Noordende JM, van der Meulen J, Daems WT. (1976) The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell Tiss Res*;173:423-435.
- Wong D. K., Dudley D. D., Afdhal N. H., Dienstag J., Rice C. M., Wang L., Houghton M., Walker B. D. and Koziel M. J. (1998) Liver-derived CTL in hepatitis C virus infection: breadth and specificity of responses in a cohort of persons with chronic infection. *J Immunol* 160, 1479-88.
- Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB, *et al.* (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. *J Virol*; 75:1229-35.
- Wunschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT. (2000) Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol.* ;74(21):10055-62.
- X**
- Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, *et al.* (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* 20:3840–48
- Y**
- Yague, J., White, J., Coleclough, C., Kappler, J., Palmer, E., and Marrack, P. (1985). The T cell receptor: the alpha and beta chains define idiotype, and antigen and MHC specificity. *Cell.* 42:81-87.
- Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. (2001) Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol.*; 167(9):5264-72
- Yawata, M., Yawata, N., Abi-Rached, L. & Parham, P. (2002). Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit. Rev. Immunol.* 22, 463–482

Yokohama, W. M. & Plougastel, B. F. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nature Rev. Immunol.* 4, 304–316

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T., (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5 (7), 730–737.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale Jr., M., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., Fujita, T., (2005). Shared and unique functions of the DExD/HBox helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* 175 (5), 2851–2858.

Young, N. T., M. Uhrberg, et al. (2001). Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. *J Immunol* 166(6): 3933-41.

Yu, H. *et al.* (1998) Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34+ human naturalkiller-cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 92, 3647–3657

Z

Zitvogel, L. (2002). Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J. Exp. Med.* 195, F9–F14

Zuniga-Pflucker J.C. (2004) T cell development made simple. *Nat Rev. Immunol.* 4, 67-72.

Résumé

Chez seulement 20 % des patients environ, l'hépatite virale C évolue vers la guérison. Pour les autres 80%, la maladie devient chronique avec un risque important de cirrhose. A l'inverse de la phase aiguë où elle peut éradiquer le virus, la réponse immunitaire est probablement la cause majeure des lésions hépatiques en phase chronique.

L'objectif de ce travail était d'analyser, chez les patients atteints d'hépatite virale C chronique, les populations lymphocytaires circulantes et intrahépatiques exprimant des récepteurs de molécules HLA de classe I qui sont très importants pour réguler la biologie des cellules Natural Killer (NK) et qui peuvent aussi être exprimés par les lymphocytes T (LT) CD8⁺ activés/mémoires. Nous avons ainsi examiné les caractéristiques et la distribution des lymphocytes T CD8⁺ exprimant NKG2A (un récepteur des molécules HLA-E) et de membres du groupe KIR (CD158a,b et CD158b,j) qui se lient à des régions polymorphiques des molécules HLA-C. Bien que les situations d'infection chronique pourraient représenter un contexte propice à l'émergence de LT CD8⁺ exprimant ces récepteurs, nous n'avons pas détecté de phénomènes d'accumulation généralisée de ces cellules dans le foie ou le sang des patients. Nous avons observé des différences de sensibilité entre LT CD8⁺NKG2A⁺ et CD8⁺KIRs⁺ vis à vis de l'influence de l'infection VHC sur le phénotype des LT CD8⁺. Par rapport aux paramètres cliniques de la maladie, nous avons observé une corrélation positive entre la fréquence intra-hépatiques des cellules T CD8⁺ exprimant NKG2A et le degré de sévérité des lésions.

Au niveau des cellules NK, nous avons observé une baisse de la fréquence des cellules NK circulantes chez les malades avec une modification de la représentation des sous types CD56^{dim} et CD56^{bright}. Dans le foie, la fréquence des cellules NK apparaît bien inférieure à celle caractérisant un foie humain normal et la proportion de certaines sous fractions de cellules NK après distinction par expression des récepteurs KIRs semble diminuée. Enfin, nous avons analysé la distribution et les caractéristiques de la sous population CD8⁺ des cellules NK. Les résultats n'ont pas révélé de distinctions phénotypiques importantes entre patients et contrôles. Par contre, la fréquence des cellules NKCD8⁺ est réduite chez les patients et leur ratio CD56^{dim}/CD56^{bright} est également modifié. Au niveau du foie, nous avons observé une corrélation positive entre la fréquence des cellules NK CD8⁺ qui infiltrent le tissu malade et le taux de transaminases. Cette association est confirmée pour la fraction CD158b,j⁺ des NKCD8⁺ intrahépatiques. Ces résultats montrent que l'analyse de l'expression de récepteurs de molécules HLA de classe I met en évidence de multiples altérations de la représentation de sous populations lymphocytaires T et NK au cours de l'hépatite virale C chronique et révèle des associations positives de certaines de ces sous populations avec des paramètres cliniques majeurs de la maladie.