HAL
open science

Potentiel immuno-thérapeutique des pDCs dans l'hépatite B chronique

Jérémie Martinet

To cite this version:

Jérémie Martinet. Potentiel immuno-thérapeutique des pDCs dans l'hépatite B chronique. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00647132

HAL Id: dumas-00647132

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00647132v1

Submitted on 1 Dec 2011

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci – La Tronche

Année : 2011 N°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE

BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLOME D'ETAT

Potentiel immuno-thérapeutique des pDCs dans l'hépatite B chronique

M. Jérémie MARTINET

Né le 08 Juillet 1981 à St Martin d'hères

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 20 Octobre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

- Pr Michel SEVE : Président de jury
- Pr Vincent LEROY
- Dr Sylvie LARRAT
- Dr Marie Jeanne RICHARD
- Dr Caroline ASPORD : Directeur de thèse

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2010-2011

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Gélénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)- ***À partir du 1er mai***
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	René	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH) - ***À partir du 1er mai***
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre Emmanuel	Maître de conférence
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	professeur Certifié

ATER (n= 5)

DEFENDI Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
GRATIA Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
REGENT Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
ROSSI Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
RUFFIN Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)
SAPIN Emilie	ATER	Physiologie Pharmacologie (HP2)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
DUCAROUGE	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET :	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ
GRENOBLE 1

Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2010-2011

MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 34)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

Dernière mise à jour : 19/05/2011 Rédacteur : F. GIGLIOTTI ; Bureau de la Scolarité Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

A Monsieur le Professeur Michel Seve,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que président du jury. Je tiens aussi à vous remercier de m'avoir donné gout à l'enseignement en me permettant d'enseigner à la faculté de pharmacie.

A Madame le Docteur Caroline ASPORD, ma Directrice de thèse

Merci de m'avoir suivi tout au long de ma thèse, de m'avoir procuré de nombreux conseils et de toujours m'avoir poussé à me dépasser.

A Madame le Docteur Marie Jeanne RICHARD,

Je tenais à vous remercier particulièrement pour tous vos conseils et de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au laboratoire immunobiologie et immunothérapie des cancers.

A Monsieur le Professeur Vincent Leroy,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et surtout pour votre aide pour le choix des patients lors de cette étude.

A Madame le Docteur Sylvie Larrat,

Je voulais vous remercier de faire partie de mon jury et surtout de toute l'aide que vous m'avez apporté lors de cette étude sur tout ce qui concernait la virologie du VHB.

A Monsieur le Docteur Joël Plumas,

Merci de m'avoir permis de travailler dans votre laboratoire et d'y effectuer ma thèse. Tous vos conseils ont été grandement appréciés.

A Monsieur le Professeur Alain Favier,

Merci de m'avoir donné gout à la recherche et aux biotechnologies dès ma deuxième année de pharmacie et de m'avoir toujours poussé dans la bonne voie.

Merci à Tania pour l'aide précieuse que tu m'as donné sur les manips surtout vers la fin.

A toute l'équipe du laboratoire R&D de l'EFS : Laurence, David, Françoise, Jean Paul, Dalil, Jérémie…

A l'équipe d'hépato-gastroentérologie pour toute l'aide que vous m'avez apporté dans le recueil des prélèvements et des données cliniques.

A l'équipe de thérapie cellulaire de l'EFS avec qui j'ai travaillé.

A tous les internes avec qui j'ai passé ces 5 années.

A mes collègues de staff O'Callaghan : David, John, Nico, Antoine pour les plus assidus.

Aux membres du bureau de la FNSIP 2010/2011 qui m'ont soutenu sur une année de présidence bien compliquée.

A Pierrick mon comparse de voyage, on repart quand tu veux.

A mes amis de promo de Pharmacie : Ben, Milouz, Tinou, O'rel, Chlo, Mathilde, Sly, Pierre Yves, François, Alexis et tout ceux que j'oublie. Que nous restions amis pour encore longtemps.

A tous ceux qui m'ont supporté pendant cette thèse : Emmanuelle, Stéphane, Aurélie…

A ma mère et mon père qui ont toujours été derrière moi dans les bons comme les mauvais moments.

A ma sœur et son mari, que je vais désormais passer voir beaucoup plus souvent à Paris.

A ma grand-mère qui s'occupe toujours de son petit-fils le Vendredi soir.

A toute la famille pour votre soutient : Denis, Marianne, David, Elie

A mes deux grands pères, vous n'êtes plus là mais je tenais à vous remercier.

Sommaire

Liste des figures : 11

Liste des abréviations : 12

1 L'hépatite B 13

A Description du VHB 13

B Physiopathologie du VHB 15

C Thérapeutiques actuelles et en développement 20

a\ Traitement prophylactique 20

b\ Traitement par IFNα 21

c\ Traitements antiviraux 21

d\ Immunothérapies en développement 22

2 Les cellules dendritiques plasmocytoides 24

A Definition 24

B Fonction des pDCs dans la réponse immune 25

a\ Réponse immune innée et pDCs 25

b\ Réponse adaptative et pDCs 25

c\ La stratégie basée sur la lignée de pDC GEN 2.2 27

3 Potentiel immuno-thérapeutique des pDCs dans l'hépatite B chronique 30

A Objectifs de l'étude 30

B Méthodologie 30

a\ Induction de lymphocytes T spécifiques de HBV ex vivo à partir de cellules de patients atteints d'hépatite B chronique 30

b\ Induction de lymphocytes T spécifiques du VHB in vivo dans un modèle de souris humanisées 32

C Résultats 34

a\ La lignée de pDC induit des lymphocytes T CD8 spécifiques d'HBc ex vivo à partir de PBMC et de LIL issus de patients atteints d'hépatite B chronique 34

b\ La non réponse à la stimulation par la lignée de pDC est associée à un fort taux de lymphocytes T régulateurs et à la présence de l'antigène HBe chez les patients 34

c\ La lignée de pDC chargée avec les peptides du VHB est plus efficace que les peptides seuls pour amplifier une réponse lymphocytaire T spécifique 35

d\ Les lymphocytes T CD8 anti-HBc amplifiés par la lignée de pDC sont fonctionnels et capables de lyser des hépatocytes humains HLA-A*0201 in vitro 36

e\ La lignée de pDC chargée avec les peptides HBs et HBc est capable d'induire des lymphocytes T CD8 anti-HBV in vivo 37

f\ La vaccination par la lignée de pDC chargée avec les peptides HBc et HBs protège la souris Hepato-Hu PBL contre l'infection par HBV 37

D Discussion 38

4 Plasmacytoid dendritic cells induce efficient stimulation of anti-viral immunity in the context of chronic HBV infection (Publication soumise à Gastroenterology) 43

CONCLUSION 78

Bibliographies: 80

Liste des figures :

Figure 1 Réponse lymphocytaire au VHB (Don Ganem, New. Eng. J. Med. 2004) 16
Figure 2 Immunopathogénèse des phases aigues et chroniques du VHB (Rehermann, Nature. Rev. Immunol. 2005) 18
Figure 3 Role des pDCs lors d'une infection (Colonna, Nature. Immunol. 2004) 27
Figure 4 Stratégie thérapeutique d'utilisation de la lignée de pDC GEN 2.2 (Aspord, Rev. Med. Int. 2010) 29
Figure 5 Stratégie expérimentale d'étude du potentiel en immunothérapie de la lignée de pDC Gen 2.2 dans le cadre de l'hépatite B chronique 32

Liste des abréviations :

VHB: Virus de l'Hépatite B

LIL: Liver infiltrating lymphocytes

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

ADNccc: ADN super enroulé

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

TCR: T cell receptor

APC: Antigen presenting cell

DC: Dendritic cell

mDC: Myeloid dendritic cell

pDC: Plasmacytoid dendritic cell

TLR: Toll like receptor

NK: Natural Killer

1 L'hépatite B

Les hépatites virales correspondent à des inflammations hépatiques plus ou moins sévères liées à une infection virale. Le virus de l'hépatite B (VHB) infecte plus de 350 millions de personnes dans le monde et environ 20% des personnes infectées développent une hépatite chronique, pouvant mener à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire[1], ce qui représente un problème majeur de santé publique [2].

A Description du VHB

Le VHB est un virus à ADN partiellement double brin de la famille des hepadnavirus capable d'infecter les hépatocytes humains [3]. Les virions du VHB sont des particules formées d'une enveloppe extérieure de lipoprotéines contenant des antigènes du virus, à l'intérieur de l'enveloppe se trouve la nucléocapside virale contenant l'ADN du VHB et la polymérase [4, 5].

On retrouve cinq antigènes majeurs composant le VHB :

- HBs retrouvé au niveau de l'enveloppe et codé à partir de la région preS-S [5, 6]
- HBc retrouvé dans la capside et codé à partir de la région preC-C [6]
- HBe qui est principalement sécrété et est aussi retrouvé dans l'enveloppe du virus, codé à partir de la région preC-C [7].

- La polymérase retrouvée dans la nucléocapside et codée à partir de la région P
- HBx dont le rôle n'est pas complètement défini, codé à partir de la région X [8]

En plus des particules virales, les cellules infectées produisent des particules non infectieuses exprimant l'un des antigènes majeurs (Ag HBs) et composées uniquement de l'enveloppe de glycoprotéines [5]. Ces particules représentent la majorité des particules virales produites (ratio : 10.000 :1).

Le cycle de réplication virale du VHB est très complexe. Ainsi le VHB est l'un des rares non rétrovirus à utiliser une reverse transcriptase lors de sa réplication. Les particules virales en circulation sont capables de se lier à certains récepteurs cellulaires afin d'être internalisées dans les hépatocytes. La nucléocapside se retrouve alors dans le cytoplasme et est transportée vers le noyau où elle libère l'ADN viral qui prend alors une forme d'ADN super enroulé (ADNccc), ce qui représente l'une des particularités du cycle du VHB [9, 10]. L'ADN viral est alors transcrit en ARN et transporté dans le cytoplasme où il est traduit pour former les différentes protéines virales. Au cours de la formation du virion, l'ARN et incorporé dans la nucléocapside puis retro-transcrit en ADN viral [11]. Un certain nombre de ces particules sont capables de retourner dans le noyau pour maintenir un pool conséquent d'ADNccc [12]. Néanmoins, la majorité de ces

particules de core vont acquérir une enveloppe et être relarguées dans la circulation afin de pouvoir infecter d'autres cellules.

B Physiopathologie du VHB

Le VHB est un virus non directement cytotoxique, de plus, la physiopathologie du VHB est très fortement liée à l'immunité de l'hôte, ainsi, la clairance virale et la pathogenèse virale sont largement mediées par la réponse immune à l'infection [13, 14].

Suite à l'infection et après une phase aigue de la maladie, la physiopathologie du VHB peut mener à deux types d'évolutions:

- Evolution vers l'élimination du virus et la résolution de l'infection
- Evolution en phase chronique retrouvée chez environ 20% des patients et qui peut mener au développement d'une hépatite chronique, à la cirrhose et au développement d'un hépato-carcinome.

En phase aigue, les patients capables d'éliminer le virus et de résoudre l'infection développent une forte réponse immune adaptative. Ainsi, après l'infection, les cellules présentatrices de l'antigène (en particulier les cellules dendritiques) sont capables de reconnaitre les antigènes viraux produits par les hépatocytes infectés et d'activer la réponse immunitaire innée et adaptative. En présentant l'antigène aux lymphocytes T CD4 et T CD8 cytotoxiques, elles

permettent l'élimination du virus soit par lyse des hépatocytes infectés, soit par production de cytokines antivirales et inflammatoires (IFNγ, IFNα, TNFα) (Figure 1). La réponse des lymphocytes T CD8 cytotoxiques est considérée comme essentielle pour l'élimination du virus et est retrouvée chez ces patients [15, 16]. Cette réponse, pour être efficace, est dirigée vers les antigènes majeurs du virus (HBc, HBs). Ainsi il a été démontré que les lymphocytes T CD8 anti-HBc étaient capables de lyser les hépatocytes infectés et d'éliminer le virus [17-20].

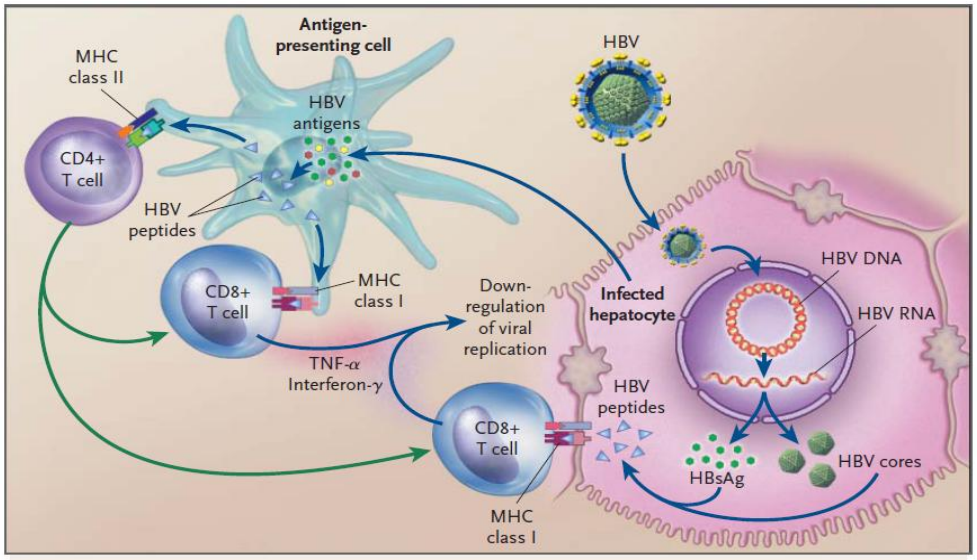


Figure 1 Réponse lymphocytaire au VHB (Don Ganem, New. Eng. J. Med. 2004)

Le virus est capable de se multiplier dans les hépatocytes, entrainant la production de particules d'Ag HBs et de particules virales complètes. Ces 2 types de particules peuvent être capturés par les cellules présentatrices de l'antigène qui dégradent les antigènes viraux en peptides. Ces peptides sont ensuite présentés au niveau des molécules CMH de classe I et II aux lymphocytes T CD8 et T CD4. Les lymphocytes T CD8 spécifiques du virus (avec l'aide des T CD4) ainsi activés peuvent reconnaitre les antigènes viraux présentés au niveau du CMH de classe I des hépatocytes infectés. Cette reconnaissance peut entrainer soit la lyse directe de l'hépatocyte, soit la libération d'IFNγ et de TNFα capables de bloquer la réplication virale et d'éliminer le virus.

Plus tardivement, la réponse humorale se développe avec la production d'anticorps protecteurs dirigés contre l'antigène HBs [21-23]. Cette séroconversion signe la fin de la phase aigue chez les patients capables de résoudre l'infection et

permet d'empêcher toute réinfection en bloquant la liaison entre les protéines virales et leurs récepteurs [21](figure 2a).

Inversement, environ 20% des patients infectés par le VHB ne sont pas capables d'éliminer le virus et développent une infection chronique. Lors de la phase aigue, la réponse immune cellulaire est faible et incapable d'éliminer les hépatocytes infectés alors que la réponse humorale (anticorps anti-HBs) ne se développe pas [13, 24]. Après plusieurs années, les patients vont développer une immunité inadaptée contre le VHB. Cette immunité comprend des lymphocytes T CD8 cytotoxiques incapables d'éliminer le virus (trop peu nombreux ou non spécifiques du virus) mais qui vont entrainer une lyse importante des hépatocytes et une hépatite [16, 25, 26](Figure 2b).

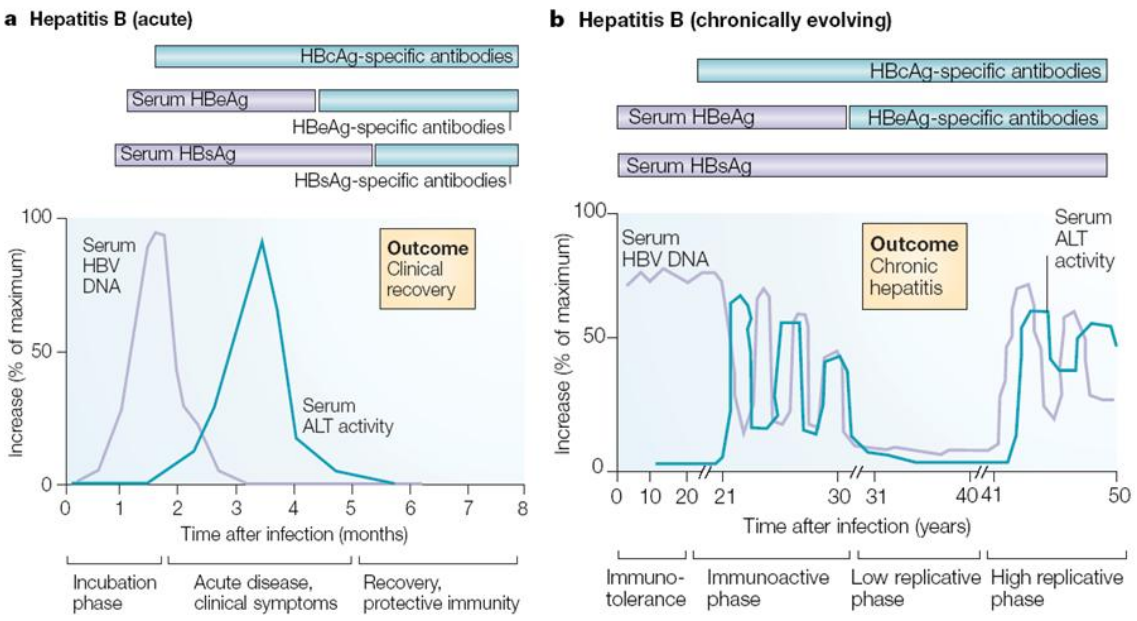


Figure 2 Immunopathogénèse des phases aigues et chroniques du VHB (Rehermann, Nature. Rev. Immunol. 2005)

(a) Après infection par le VHB, on observe une augmentation de la charge virale, suivie chez les patients capables de résoudre l'infection d'une activation de la réponse lymphocytaire T CD8 anti-VHB qui entraine une augmentation transitoire des transaminases lors de la lyse des hépatocytes infectés. Les antigènes HBe et HBs sont rapidement retrouvés dans le sérum des patients et disparaissent avec l'apparition plus tardive d'anticorps anti-HBe et HBs protecteurs. Le patient a alors résolu l'infection.

(b) Chez les patients qui ne sont pas capables d'éliminer le VHB, on retrouve après l'infection par le virus une augmentation de la charge virale qui peut persister pendant des années. La réponse lymphocytaire T CD8 ne s'active pas avant plusieurs années tout comme la production des anticorps anti-HBs et HBe. Après plusieurs années, la réponse lymphocytaire T CD8 s'active mais n'est pas capable d'éliminer le virus, entrainant l'apparition d'une hépatite chronique (augmentation des transaminases sur plusieurs mois). Les anticorps anti-HBe peuvent apparaitre après plusieurs années mais ne sont pas associés à une résolution de la maladie.

Le virus est donc capable de limiter la réponse immunitaire anti VHB. Cet état de relative tolérance vis-à-vis du VHB semble être lié à la charge virale. Ainsi, il a été démontré chez les patients atteints d'hépatite B chronique que la fréquence et la fonctionnalité des lymphocytes T CD8 anti-VHB était dépendante de la charge virale[15]. L'antigène HBe joue lui aussi un rôle important de part son caractère immunomodulateur [27-29]. Ainsi il a été démontré que l'antigène HBe était capable de moduler la réponse T CD8 contre l'antigène HBc au cours de

l'infection [29]. Il a de plus été observé chez les patients infectés par un VHB incapable de produire l'antigène HBe une exacerbation de l'hépatite [30].

D'autres facteurs en parallèle de la quantité des antigènes viraux peuvent expliquer la réponse immune inadaptée au virus lors de l'infection chronique. Ainsi, les patients en phase chronique développent une réponse lymphocytaire T régulatrice plus forte que chez les patients ayant résolu l'infection. Il a été démontré que les lymphocytes T régulateurs étaient capables de moduler la réponse lymphocytaire T CD8, limitant ainsi l'élimination du virus [31-33].

L'environnement hépatique contribue aussi au maintient de la tolérance immunologique vis-à-vis du VHB. En effet, il a été démontré dans certains modèles animaux que la réponse antivirale lymphocytaire T CD8 était altérée au niveau hépatique [34]. De plus, les hépatocytes n'expriment que faiblement les molécules CMH de classe I et nécessitent donc une concentration cent fois supérieur en peptide viraux par rapport aux autres APC pour stimuler aussi efficacement les lymphocytes T CD8 [35]. Ceci suggère que les pathogènes infectant les hépatocytes sont moins bien reconnus par les lymphocytes T CD8, ce qui pourrait en partie expliquer comment le VHB se développe en évitant d'être détecté par le système immunitaire.

En considérant l'ensemble de ces données, il semblerait que ce soit l'incapacité du système immunitaire à éliminer le virus ainsi que l'alternance entre phase de

lyse des hépatocytes et phase de forte réplication virale qui expliquent la physiopathologie particulière du VHB [14].

C Thérapeutiques actuelles et en développement

Un traitement efficace contre le VHB devrait permettre l'élimination du virus et empêcher le développement de lésions hépatiques. Si les traitements actuels sont capables de bloquer la réplication virale et de réduire le risque d'hépatite, ils ne sont pas capables d'éliminer complètement le virus et de résoudre l'infection. C'est pourquoi de nouvelles thérapeutiques sont en développement, basées sur le constat que le système immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle du VHB et qu'en cas d'infection chronique il est nécessaire de pouvoir le réactiver afin de pouvoir résoudre l'infection.

a\ Traitement prophylactique

Il existe depuis plusieurs années un vaccin prophylactique, composé de l'antigène HBs et d'adjuvants immuno-activateurs (hydroxyde d'aluminium), qui permet de protéger les patients contre l'infection au VHB. Néanmoins, malgré l'existence de ce vaccin, l'infection reste présente, soit dans des pays où la vaccination n'est pas possible pour des raisons financières, soit par une couverture vaccinale trop faible liée à une méfiance vis-à-vis de la vaccination anti-HBV [36]. De plus, malgré de nombreux essais, ce vaccin n'a pas démontré

d'effet thérapeutique chez les patients en phase chronique que ce soit seul ou combiné à d'autres thérapeutiques antivirales [37-40].

b\ Traitement par IFNα

L'IFNα a été pendant des années le traitement de référence dans le traitement contre l'hépatite B jusqu'à l'arrivée des antiviraux. Il permet de réduire la charge virale en bloquant la replication du virus et en stimulant l'immunité principalement cellulaire contre les hépatocytes infectés [41-44].

Néanmoins les nombreux effets indésirables (fièvre, myalgies, hépatites aigues) et sa faible efficacité (30% des patients répondent au traitement) ont réduit son utilisation avec l'apparition des antiviraux classiques [45, 46]. Il existe depuis quelques années une forme pégylée de l'IFNα qui a permis de simplifier le traitement et de limiter ses effets indésirables.

c\ Traitements antiviraux

Les traitements antiviraux visent à bloquer le cycle de réplication virale en inhibant des étapes clefs. Ces traitements correspondent à des analogues nucléosidiques comme la Lamivudine ou l'entécavir, et des analogues nucléotidiques comme le ténofovir ou l'adéfovir, capables d'inhiber la réplication du virus en bloquant l'ADN polymérase virale. Ils entrainent une réduction à la fois de la charge virale et des risques de lésions hépatiques et peuvent entrainer une séroconversion HBe chez un grand nombre de patients (disparition de la charge virale chez 60 à 80% des patients), mais ils ne sont pas

capables d'éliminer complètement le virus qui reste latent dans les hépatocytes (résolution de l'infection chez <3% des patients traités) [47-49]. Il existe de plus en plus de cas de développement de résistance du virus à ces traitements, pouvant en limiter l'utilisation sur le long terme [50-52].

d\ Immunothérapies en développement

La réponse immunitaire est un élément clef dans la régulation et l'élimination du virus, les patients capables d'éliminer le virus possédant une forte réponse spécifique lymphocytaire T (T anti-HBc principalement) et une réponse humorale adaptée. C'est pourquoi un certain nombre d'immunothérapies visant à rétablir la réponse lymphocytaire T CD8 sont en cours de développement.

Ainsi sont en cours d'essai des vaccins à ADN visant à générer plusieurs épitopes antigéniques afin d'amplifier une réponse immune poly-spécifique [53, 54]. Ces vaccins ont été testés dans des modèles de souris transgéniques HLA-A*0201^{+} et ont permis l'amplification de lymphocytes T anti-VHB dirigés contres plusieurs peptides immunodominants. Des vaccins à lipopeptides [55] ont aussi été testés. Ainsi, un vaccin à lipopeptide exprimant le peptide HBc (18-27) a été testé in vivo chez l'homme et a montré chez environ 30% des patients atteints d'hépatite B chronique une amplification de la réponse lymphocytaire T CD8. D'autres immunothérapies ont aussi été analysées comme les thérapies adoptives à base de lymphocytes T CD8 exprimant un TCR transduit, spécifique des antigènes du VHB [56]. Ce modèle a été testé in vitro sur des lymphocytes T

issus de patients atteints d'hépatites B chronique et a démontré son efficacité. Les lymphocytes T exprimant un TCR transduit du VHB ont ainsi été capables de lyser spécifiquement des hépatocytes infectés. Enfin, des vaccins utilisant des cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) autologues chargées avec des antigènes viraux (HBc, HBs), ont été capables d'induire une réponse cytotoxique spécifique importante [57]. Dans cette étude, des mDCs chargées avec un peptide viral issu de l'antigène HBc ont été capables d'amplifier une réponse lymphocytaire de type TH1 in vitro permettant d'obtenir des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB. Ces lymphocytes sont fonctionnels et capables de lyser des cellules T2 loadées avec le peptide d'intérêt in vitro.

Le développement de nouvelles immunothérapies est particulièrement compliqué à cause du manque de modèle animal relevant pour mesurer leur efficacité dans un contexte immunitaire humain. De plus, bien que certains traitements soient entrés en phase de développement préclinique, il n'existe pas de traitement d'immunothérapie efficace en contexte VHB à ce jour. Il serait pourtant très intéressant de pouvoir développer une immunothérapie capable d'éliminer le VHB et de résoudre l'infection.

2 Les cellules dendritiques plasmocytoides

A Definition

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle de sentinelles dans l'organisme. Elles sont capables de reconnaitre de nombreux agents pathogènes et d'activer à la fois l'immunité innée et adaptative de par leur production de cytokine et leur rôle de cellules présentatrices de l'antigène (APC) [58, 59].

Il existe plusieurs sous-types de DCs qui différent par leurs phénotypes, leurs localisations et leurs rôles souvent complémentaires. Nous nous sommes focalisés au cours de cette étude sur les cellules dendritiques plasmocytoides (pDC) car elles jouent un rôle primordial dans l'immunité antivirale.

Les pDCs sont rares en circulation (0,3-0,5% des cellules du sang périphérique), se développent dans la moelle et résident dans les organes lymphoïdes [60, 61].

Les pDCs expriment BDCA-2, CD123 et BDCA-4, ce qui permet de les différencier des autres cellules dendritiques [59, 62, 63]. Elles expriment aussi faiblement les molécules de CMH de classe II ainsi que les molécules de co-stimulation. Elles n'expriment pas le CD11c. Les pDCs expriment deux « Toll like » recepteurs, TLR7 et TLR9 qui reconnaissent respectivement l'ARN simple brin (virus influenza) et l'ADN non méthylé contenant le motif CpG (ADN bactériens et viraux) comme ligands[64-68]. En réponse à cette stimulation, les pDCs produisent de grandes quantités d'IFNα.

B Fonction des pDCs dans la réponse immune

a\ Réponse immune innée et pDCs

L'un des rôles principaux des pDCs est leur capacité à produire de l'IFNα suite à une stimulation TLR, ce qui en fait des cellules majeures pour la réponse antivirale. L'IFNα à des propriétés antivirales directes, limitant la réplication virale, mais surtout est capable de stimuler la réponse immune en augmentant l'expression des molécules CMH de classe I sur les cellules infectées ou en activant l'activité cytolytique des NK [68-70]. Les pDCs sont aussi capables de produire d'autres molécules pro-inflammatoires comme le TNFα ou l'IL6 [67]. Enfin les pDCs peuvent directement stimuler certaines cellules grâce à leurs molécules de co-stimulations. Ainsi les NK peuvent être directement activés par l'interaction Ox40/Ox40L entre NK et pDCs [71] (Figure 3).

b\ Réponse adaptative et pDCs

Les pDCs, une fois activées, sont capables de faire le lien entre immunité innée et adaptative [59]. L'IFNα, produit par les pDCs, peut ainsi stimuler les lymphocytes T CD4+ naïfs, induisant une réponse de type TH1 [72, 73], stimuler les mDCs [74] et activer les lymphocytes B en plasmocytes en association avec l'IL6, induisant ainsi la production d'immunoglobulines [75].

Les pDCs en contexte d'infection virale, sont capables de présenter les antigènes viraux et d'activer la réponse T CD8 spécifiques afin de permettre l'élimination du virus [76]. L'une des fonctions essentielles pour la présentation d'antigènes est la capacité de cross-présentation qui permet de présenter des antigènes exogènes. La cross-présentation est essentielle lorsque le virus n'infecte pas l'APC. Il a récemment été démontré que les pDCs étaient capables de cross-présenter les antigènes viraux et d'activer les lymphocytes T spécifiques [76-78]. Il a de plus été démontré in vivo dans le cadre de l'infection à HSV que les pDCs jouaient un rôle majeur [79]. Dans un modèle animal d'infection HSV, la déplétion des pDCs a entrainé une diminution de l'amplification des lymphocytes T spécifiques du virus, empêchant son élimination. Il a de plus été démontré dans un modèle in vivo après activation par le virus influenza que les pDCs étaient capable d'induire des lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoires [80]. Tout ceci démontre le rôle essentiel des pDCs dans l'immunité antivirale.

Les pDCs peuvent donc à la fois activer l'immunité innée et l'immunité adaptative en réponse à une infection virale, induisant l'élimination du virus par leur production d'IFN de type I et l'activation de la réponse T CD8 cytotoxique par leurs propriétés d'APC (Figure 3). Leur rôle est cependant encore mal défini en situation d'hépatite B chronique. Néanmoins, l'ensemble de ces caractéristiques peut rendre l'utilisation des pDCs très intéressante en vue d'une immunothérapie en contexte d'infection virale chronique.

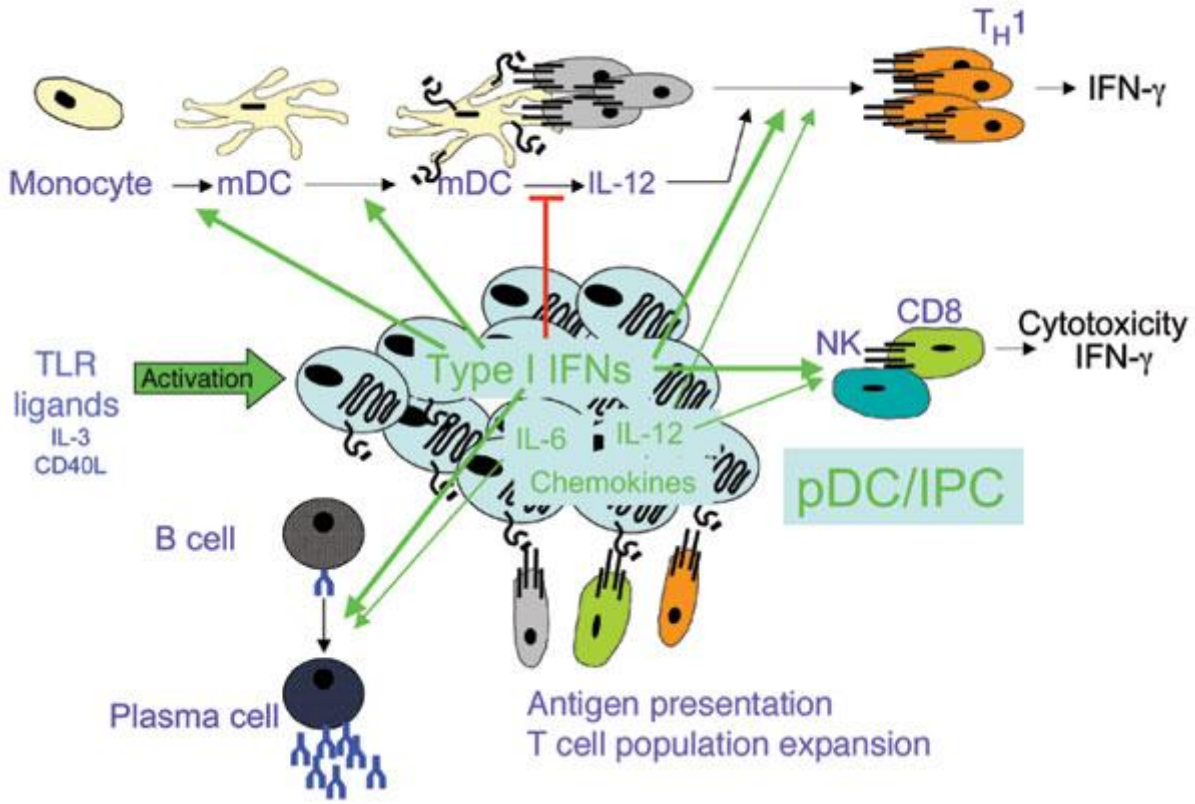


Figure 3 Role des pDCs lors d'une infection (Colonna, Nature. Immunol. 2004)

Après infection virale, les pDCs sont capables de reconnaitre directement le virus via ses TLR ou en captant les antigènes viraux présentés par les cellules infectées. Une fois activée, la pDC produit de grandes quantités d'interféron de type I qui permettent l'activation de l'immunité innée (NK, macrophages). Les pDCs vont ensuite présenter l'antigène aux lymphocytes T CD8 et T CD4 via les CMH de classe I et II et ainsi activer la réponse immune adaptative permettant l'élimination du virus. Les pDCs peuvent aussi activer les lymphocytes B afin d'induire la production d'anticorps spécifiques du virus.

c\ La stratégie basée sur la lignée de pDC GEN 2.2

L'étude des pDCs est limitée par leur faible pourcentage en circulation, ce qui peut compliquer leur utilisation en immunothérapie.

Notre laboratoire a pu mettre au point une lignée de pDC obtenue à partir de pDCs primaires leucémiques issues d'un patient HLA-A*0201^{+} [81]. La lignée de pDC GEN 2.2 possède les mêmes caractéristiques phénotypiques et

fonctionnelles que les pDCs primaires et a pu être utilisée pour mieux étudier les pDCs in vitro [82, 83].

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie basée sur la lignée de pDC a été développée dans le laboratoire. Cette stratégie consiste à charger des peptides immunodominants issus d'antigènes tumoraux ou viraux sur la lignée de pDC irradiée dans un contexte allogénique HLA-A*0201 restreint afin d'induire des lymphocytes T CD8 spécifiques (Figure 4). Cette stratégie peut être utilisée directement par vaccination avec la lignée de pDC chargée et irradiée ou indirectement par amplification ex vivo de lymphocytes T CD8 spécifiques qui seront ensuite injectés au patient. Cette stratégie a déjà été développée en contexte de cancer (mélanome) [84] et d'infection virale (EBV, CMV) [85].

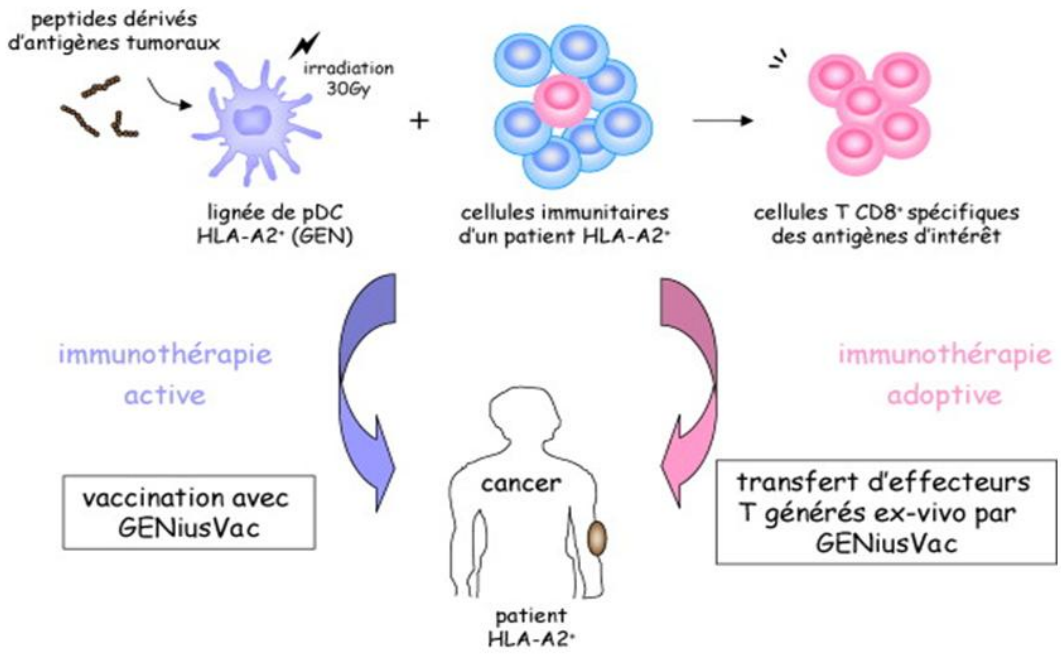


Figure 4 Stratégie thérapeutique d'utilisation de la lignée de pDC GEN 2.2 (Aspord, Rev. Med. Int. 2010)

La lignée de pDC GEN 2.2 est mise en contact avec des peptides issus d'antigènes tumoraux ou viraux, qu'elle capture et présente aux lymphocytes du patient dans un contexte HLA-A*0201 restreint. Après stimulation, les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène d'intérêt s'amplifient. Cette stratégie thérapeutique peut être utilisée soit comme une immunothérapie active en injectant directement la lignée de pDC chargée et irradiée, soit comme une immunothérapie adoptive en stimulant ex vivo les lymphocytes T CD8 spécifiques issus des PBMC du patient avec la lignée de pDC, qui sont ensuite réinjectés.

3 Potentiel immuno-thérapeutique des pDCs dans l'hépatite B chronique

A Objectifs de l'étude

Nous avons étudié le potentiel immuno-thérapeutique de la lignée de pDC GEN 2.2 dans le cadre de l'hépatite B chronique. Pour cela nous avons déterminé la capacité de la lignée de pDC à induire des lymphocytes T CD8 spécifiques et fonctionnels ex vivo à partir de prélèvements de patients HLA-A*0201^{+}. Nous avons ensuite mis au point un modèle animal murin permettant d'étudier le potentiel vaccinal et l'efficacité thérapeutique de la stratégie in vivo en contexte d'un système immunitaire humain.

B Méthodologie

a\ Induction de lymphocytes T spécifiques de HBV ex vivo à partir de cellules de patients atteints d'hépatite B chronique

La lignée de pDC a tout d'abord été chargée avec des peptides HLA-A*0201 restreints issus des antigènes d'intérêt (HBs et HBc) puis irradiée afin de bloquer sa prolifération. La lignée de pDC a ensuite été co-cultivée avec des PBMC purifiés à partir de prélèvements sanguins de patients atteints d'hépatite B chronique ou des lymphocytes infiltrant le foie (LIL) issus de biopsies

hépatiques de patients HBV chronique. Les cellules ont été restimulées une fois par semaine (figure 5).

Avant et après stimulation, nous avons évalué par cytométrie de flux, par marquage tétramère, le pourcentage de lymphocytes T CD8 spécifiques du peptide d'intérêt obtenus. Nous avons ensuite déterminé si les lymphocytes T CD8 obtenus étaient fonctionnels en mesurant leur activité cytotoxique après une re-stimulation (cellules T2 présentant le peptide d'intérêt ou un peptide contrôle, lignée d'hépatocytes HepG2/HepG2 2.15 transfectée ou non avec le VHB) en utilisant le test de cytotoxicité au ^{51}Cr ou un test au CFSE ou la mesure de l'expression de CD107 en surface.

Afin d'évaluer l'intérêt de la stratégie, nous avons comparé l'efficacité de la stimulation des lymphocytes T CD8 par la lignée de pDC chargée avec des peptides du VHB, avec la stimulation par les peptides seuls comme décrit dans la littérature [16].

Nous avons ensuite analysé les caractéristiques cliniques et le taux de lymphocytes T régulateurs des patients testés afin d'évaluer si il existe une corrélation entre ces paramètres et la réponse à la stimulation par la lignée de pDC.

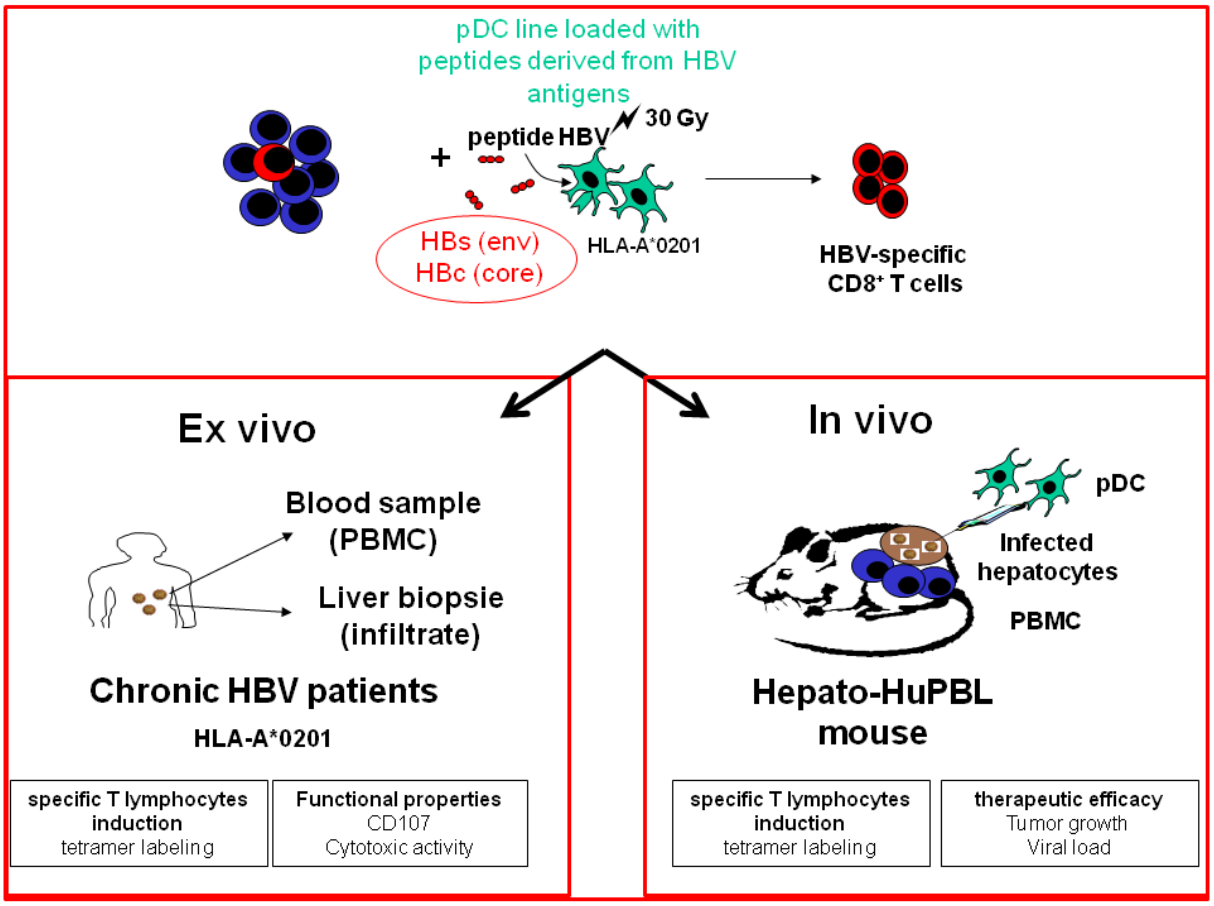


Figure 5 Stratégie expérimentale d'étude du potentiel en immunothérapie de la lignée de pDC Gen 2.2 dans le cadre de l'hépatite B chronique

La lignée de pDC chargée avec des peptides HLA-A*0201 restreints issus des antigènes HBs ou HBc et irradiée, a été utilisée pour stimuler les lymphocytes T spécifiques du VHB issus de prélèvements de patients atteints d'hépatite B (sang ou biopsie hépatique) à la fois ex vivo et in vivo dans un modèle animal de souris humanisées et transplantées avec des hépatocytes humains (Hepato-HuPBL).

b\ Induction de lymphocytes T spécifiques du VHB in vivo dans un modèle de souris humanisées

Afin de mesurer in vivo l'efficacité de la lignée de pDC à induire des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB et son efficacité thérapeutique dans un contexte immunitaire humain, nous avons mis au point un modèle de souris humanisées : souris immunodéficientes NOD-SCIDβ2m$^{-/-}$ irradiées, humanisées

avec des PBMC humain et transplantées avec la lignée d'hépatocytes transfectée ou non avec le VHB (modèle Hepato-HuPBL)

Dans un premier temps nous avons injecté une fois par semaine la lignée de pDC chargée avec les peptides HBs et HBc et irradiée dans des souris humanisées avec des PBMC issus d'un patient HBV résolu HLA-A*0201^{+} (souris HuPBL) et après 2 vaccinations nous avons mesuré par cytométrie de flux dans différents organes l'amplification des lymphocytes T CD8 spécifiques (HBs et HBc) par marquage tétramère.

Nous avons ensuite transplanté en sous cutané une lignée d'hépatocytes humains transfectée (HepG2 2.15) ou non (HepG2) avec le VHB, 7 jours après la première vaccination. Nous avons suivi l'évolution des hépatocytes injectés en mesurant régulièrement la taille de la tumeur et l'évolution de la charge virale en circulation. Nous avons mesuré l'amplification des lymphocytes T CD8 spécifiques dans les différents organes en point final. Nous avons ainsi pu évaluer l'efficacité thérapeutique de la stratégie (Figure 5).

C Résultats

a\ La lignée de pDC induit des lymphocytes T CD8 spécifiques d'HBc ex vivo à partir de PBMC et de LIL issus de patients atteints d'hépatite B chronique

Nous avons pu observer chez certains patients HLA-A*0201^{+} atteints d'hépatite B chronique une amplification importante des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB dans respectivement 45,8% et 66,6% des échantillons de PBMC et LIL. Nous avons alors distingué deux groupes de patients : les patients capables de répondre à une stimulation par la lignée de pDC (%T anti-HBc>0,24% après 14 jours de stimulation) appelés « répondeurs » et ceux qui ne répondent pas à la stimulation par la lignée de pDC (%T anti-HBc<0,24% après 14 jours de stimulation) appelés « non répondeurs ».

La lignée de pDC est donc capable d'induire une forte amplification de lymphocytes T CD8 anti-HBc ex vivo chez certains patients atteints d'hépatite B chronique.

b\ La non réponse à la stimulation par la lignée de pDC est associée à un fort taux de lymphocytes T régulateurs et à la présence de l'antigène HBe chez les patients

Nous avons tout d'abord comparé le taux de lymphocytes T régulateurs entre patients répondeurs et non répondeurs et nous avons pu constater que ce taux était significativement supérieur chez les patients non répondeurs. Nous avons

ensuite analysé les caractéristiques cliniques des patients répondeurs et non répondeurs et nous avons pu observer que le seul paramètre significativement différent entre ces deux groupes était la présence ou non d'antigène HBe en circulation. Cette observation est ainsi extrêmement relevante chez deux patients pour lesquels nous avons testé la stimulation par la lignée de pDC à 6 mois d'intervalle. Ainsi un patient antigène HBe négatif répondeur à la stimulation par la lignée lors du premier prélèvement est devenu non répondeur sur le deuxième prélèvement, parallèlement à une positivité transitoire de l'antigène HBe. Un autre patient antigène HBe positif étonnement répondeur à la stimulation par la lignée est devenu antigène HBe négatif 6 mois plus tard. Il semble donc que le statut antigène HBe et le niveau de lymphocytes T régulateurs permet de distinguer répondeurs et non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC.

c\ La lignée de pDC chargée avec les peptides du VHB est plus efficace que les peptides seuls pour amplifier une réponse lymphocytaire T spécifique

Nous avons comparé l'efficacité de la stimulation des lymphocytes T spécifique du VHB issus de patients hépatite B chronique par la lignée de pDC chargée avec des peptides du VHB (HBc) ou par le peptide seul. Nous avons obtenu un plus fort pourcentage et une meilleure amplification du nombre absolu de

lymphocytes T CD8 anti-HBc après 2 stimulations par la lignée de pDC plutôt par rapport au peptide seul.

La stimulation par la lignée de pDC des lymphocytes T spécifiques du VHB est donc plus efficace que la stimulation par le peptide seul, soulignant l'intérêt de la stratégie.

d\ Les lymphocytes T CD8 anti-HBc amplifiés par la lignée de pDC sont fonctionnels et capables de lyser des hépatocytes humains HLA-A*0201 in vitro

Afin d'évaluer la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques obtenus nous avons tout d'abord mesuré l'expression de PD-1, marqueur d'exhaustion fréquemment observé sur les lymphocytes T antiviraux en phase chronique d'infection. Nous n'avons pas observé d'expression de ce marqueur sur les lymphocytes CD8 spécifiques du VHB amplifiés par la lignée de pDC, même après 2 stimulations.

Nous avons ensuite évalué l'activité cytotoxique des lymphocytes T en utilisant un test de relargage du ^{51}Cr sur des cellules T2 présentant le peptide HBc ou un peptide non relevant. Nous avons pu observer que les lymphocytes T CD8 étaient capables de lyser spécifiquement les cellules T2 présentant l'antigène HBc et d'exprimer la molécule CD107 à leur surface.

Nous avons finalement analysé l'efficacité cytotoxique des lymphocytes T CD8 anti-HBc sur une lignée d'hépatocytes humains HLA-A*0201 transfectée (HepG2 2.15) ou non (HepG2) par le VHB en utilisant un test au CFSE. Les lymphocytes T étaient capables de lyser spécifiquement les hépatocytes infectés par le virus, confirmant qu'ils sont complètement fonctionnels.

e\ La lignée de pDC chargée avec les peptides HBs et HBc est capable d'induire des lymphocytes T CD8 anti-HBV in vivo

Afin d'évaluer si la lignée de pDC est capable d'induire in vivo une réponse antigène spécifique lymphocytaire T CD8 contre le VHB, nous avons injecté la lignée de pDC une fois par semaine à des souris Hu-PBL. Après 2 vaccinations, nous avons pu observer au niveau du site d'injection (lavage péritonéal), des ganglions drainants (mésentérique, axillaire et inguinal) et d'un organe lymphoïde secondaire (rate) l'amplification de lymphocytes T CD8 spécifiques des antigènes HBc et HBs. Nous avons ainsi pu confirmer in vivo l'efficacité de la stimulation de la réponse lymphocytaire T spécifique du VHB par la lignée de pDC.

f\ La vaccination par la lignée de pDC chargée avec les peptides HBc et HBs protège la souris Hepato-Hu PBL contre l'infection par HBV

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique in vivo de la lignée de pDC, nous avons injecté la lignée de pDC chargée avec les peptides HBc et HBs à des

souris Hu PBL. Après une semaine nous avons transplanté les souris Hu PBL avec la lignée HepG2 ou HepG2 2.15 (Hepato-Hu PBL) et vacciné ces souris une fois par semaine avec la lignée de pDC. Après 2 injections, nous avons pu observer que le vaccin composé de la lignée de pDC chargée avec les peptides HBc et HBs était capable d'inhiber spécifiquement le développement de la lignée HepG2 2.15. Le développement de la lignée HepG2 n'est pas affecté par la vaccination. La charge virale mesurée dans le sérum après 2 stimulations chez les souris Hepato-HuPBL vaccinées avec le vaccin composé de la lignée de pDC chargée avec les peptides HBc et HBs était significativement plus faible comparé aux souris vaccinées avec le contrôle. De plus, nous avons pu retrouver au niveau des hépatocytes injectés en sous cutané des lymphocytes T CD8 spécifiques des peptides HBc et HBs, démontrant que les lymphocytes amplifiés par la lignée de pDC ont pu migrer vers le site d'infection, lyser les hépatocytes infectés et réduire la charge virale.

D Discussion

Actuellement, les thérapeutiques antivirales ne sont pas capables de résoudre l'infection chronique au VHB et d'éliminer définitivement le virus. La résolution de l'infection nécessite le développement d'une réponse lymphocytaire T CD8 spécifique du VHB capable de lyser les hépatocytes infectés et d'éliminer le virus, hors les pDCs sont connues pour être un des

éléments majeur de l'induction de la réponse immunitaire antivirale ce qui en fait une cible intéressante pour le développement d'immunothérapies. Nous avons pu démontrer lors de cette étude qu'une lignée de pDC irradiée, chargée avec des peptides HLA-A*0201 restreints dérivés d'antigènes du VHB pouvait amplifier efficacement une réponse lymphocytaire T CD8 spécifique et fonctionnelle ex vivo à partir de prélèvements de patients hépatite B chronique et prouvé son efficacité in vivo dans un nouveau modèle de souris Hepato-HuPBL.

Ex vivo pour le groupe de patients répondeurs autant que in vivo dans le modèle animal de souris Hepato-HuPBL, la stimulation par la lignée de pDC a permis d'obtenir une forte amplification de lymphocytes T CD8 spécifiques anti-HBV fonctionnels, capables de lyser les hépatocytes infectés et de réduire la charge virale. De plus, bien que lors de l'hépatite B chronique il a été décrit une exhaustion des lymphocytes intrahépatiques T CD8 spécifiques [86], la lignée de pDC a été capable d'amplifier fortement une réponse immunitaire lymphocytaire T efficace in situ à partir de LIL. Enfin, la stimulation par la lignée de pDC a démontré une amplification de la réponse lymphocytaire plus forte que lors de l'utilisation du peptide seul, ainsi qu'une cinétique d'amplification plus rapide que lors de l'utilisation de mDCs [57]. Ces résultats encourageants montrent que l'utilisation de la lignée de pDC dans le traitement de l'hépatite B pourrait être une immunothérapie de choix. Un autre intérêt de

notre stratégie est qu'à la différence d'autres stratégies d'immunothérapie, elle peut permettre d'amplifier la réponse immunitaire contre plusieurs antigènes différents en modifiant les peptides chargés sur la pDC. De plus, le fait d'utiliser une lignée de pDC en situation allogénique HLA-A*0201 restreinte plutôt que des cellules dendritiques en autologues (comme c'est le cas pour des stratégies en cours de développement utilisant des cellules dendritiques en autologue [57, 87]) simplifie la stratégie en vue de son utilisation en immunothérapie en permettant de traiter immédiatement les patients HLA-A*0201^{+} (environ 30-40% de la population).

La stratégie utilisant la lignée de pDC semble donc capable de rétablir une réponse lymphocytaire T anti-VHB chez les patients atteints d'hépatite B chronique. Néanmoins, bien que la réponse lymphocytaire T cytotoxique soit nécessaire pour éliminer le VHB, elle pourrait être aussi responsable des lésions hépatiques lors de la phase chronique, bien qu'il ai aussi été décrit une réponse cytotoxique sans lésions hépatiques [16]. Il a de plus été démontré que la charge virale pouvait contrôler les fonctions des lymphocytes T CD8 [35]. Le risque de toxicité hépatique de notre stratégie devra donc être étudié de manière plus approfondie. Réguler la charge virale par des traitements antiviraux classiques avant d'utiliser la lignée de pDC pour réactiver la réponse immunitaire pourrait permettre de réduire le risque de toxicité hépatique de notre stratégie et en optimiser l'efficacité.

Nous avons démontré que l'activation de la réponse immunitaire par la lignée de pDC était fortement corrélée au niveau de lymphocytes T régulateurs et à la présence de l'antigène HBe. La présence de lymphocytes T régulateurs et leur relation avec le passage en phase chronique avaient déjà été démontrées précédemment [31, 32]. De plus, L'antigène HBe est connu pour être un immunomodulateur puissant, capable d'inhiber la réponse immunitaire contre l'antigène HBc [29]. Nos résultats confirment ces observations. Le taux de lymphocytes T régulateurs et la présence de l'antigène HBe représentent donc des facteurs important quand à la réussite de notre stratégie d'immunothérapie et devront être évalués afin de l'optimiser.

Un certain nombre de modèles animaux ont été développés pour évaluer l'efficacité des traitements antiviraux dans l'hépatite B. Néanmoins, ces modèles ne sont pas utilisables dans l'évaluation des réponses immunes humaines dans le cadre d'essais d'immunothérapies [25, 88]. C'est pourquoi nous avons développé un nouveau modèle de souris Hepato-HuPBL permettant de tester des immunothérapies dans un contexte immunitaire humain en présence d'hépatocytes humains infectés par le VHB. Ce modèle pourrait permettre d'aider à améliorer les études précliniques en immunothérapie dans le cadre de l'infection au VHB.

Au cours de cette étude, nous avons pu démontrer que la lignée de pDC chargée avec des peptides du VHB et irradiée était capable d'amplifier des lymphocytes

T CD8 spécifiques du virus et fonctionnels, issus de patients atteints d'hépatite B, à la fois ex vivo et in vivo dans un modèle de souris humanisée (Hepato-HuPBL). Cette stratégie pourrait donc se révéler très intéressante en vue de développer une immunothérapie anti-VHB chez l'homme.

4 Plasmacytoid dendritic cells induce efficient stimulation of anti-viral immunity in the context of chronic HBV infection (Publication soumise à Gastroenterology)

Title

Plasmacytoid dendritic cells induce efficient stimulation of anti-viral immunity in the context of chronic HBV infection

Short title

Anti-HBV immunity and pDCs

Authors

Jeremie Martinet[1,2,4], Vincent Leroy[2,3], Tania Dufeu-Duchesne[2,3], Sylvie Larrat[6], Marie-Jeanne Richard[2,4], Fabien Zoulim[5], Joel Plumas[1,2,7], Caroline Aspord[1,2]

Department and Institutions

[1]EFS Rhone-Alpes, R&D Laboratory, La Tronche, F-38701 France

[2]University Joseph Fourier, Grenoble, F-38041 France; INSERM, U823, Immunobiology & Immunotherapy of Cancers, La Tronche, F-38706 France

[3]CHU Grenoble, Michallon Hospital, Hepato-gastroenterology unit, Grenoble, F-38043 France

[4]CHU Grenoble, Michallon Hospital, Cancerology and Biotherapy, Grenoble, F-38043 France

[5]INSERM U871, Molecular Pathobiology and New Treatments of Viral Hepatitis, Lyon, F-69003 France

[6]CHU Grenoble, Michallon Hospital, Virological laboratory / UMI 3265 CNRS-UJF-EMBL, Grenoble, F-38043 France

[7]University College London, Cancer Institute, 72 Huntley Street WC1E 6BT, UK

Grant support

Our work was supported by the French Blood Agency (EFS) and the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS).

Abbreviations

HBV, hepatitis B virus; LIL, liver-infiltrating lymphocytes; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; pDC, plasmacytoid Dendritic Cell.

Correspondence

Caroline Aspord, R&D Laboratory EFS Rhone-Alpes, 29 avenue du Maquis Gresivaudan, 38701 La Tronche, France. E-mail : carolineaspord@yahoo.com. Phone : +33 (0) 4 76 42 43 44. FAX : +33 (0) 4 76 54 69 18.

Disclosures

The authors disclose no conflicts of interest.

Author Contributions

Conception and design of the study: CA, JP, JM, VL; Acquisition and analysis of data: JM, TDD, CA; Interpretation of data: JM, CA, JP, VL; Material support: VL, FZ, SL, MJR; Drafting of the manuscript: CA, JM; Revision of the manuscript: JP, VL, FZ.

Abstract

Background & Aims: The immune control of HBV infection is essential for viral clearance. Restoring functional anti-HBV immunity is therefore a promising immunotherapeutic approach. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) play a crucial role in anti-viral immunity due to their ability to capture and process viral antigens and subsequently induce adaptive immune responses. We therefore investigated for the first time the potential of pDCs in triggering anti-viral immunity against HBV. **Methods:** We used a HLA-A*0201^{+} pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted peptides derived from HBc/HBs antigens to amplify specific T cells ex-vivo from chronic HBV patients and established an Hepato-HuPBL humanized mouse model to address the therapeutic potential of the strategy in vivo. **Results:** Stimulation of PBMC or liver-infiltrated lymphocytes from HLA-A*0201^{+} chronic HBV patients by the HBc peptide-loaded pDC line elicited HBV-specific CD8 T cells in 45.8% of cases. The specific T cells of the "responder" group were able to express CD107 upon restimulation and lyse infected hepatocytes in-vitro. The "non-responder" group of patients was characterised by the presence of HBeAg or higher level of regulatory T cells. The therapeutic efficacy of the pDC-vaccine was evaluated in immunodeficient NOD-SCIDβ2m$^{-/-}$ mice reconstituted with HBV patients' PBMC and xenotransplanted with human HBV-infected hepatocytes. Vaccination of Hepato-HuPBL mice with the HBc/HBs peptide-loaded pDC line elicited HBV-specific T cells in-vivo able to specifically lyse infected hepatocytes. **Conclusions:** pDCs loaded with HBV-derived peptides can elicit functional virus-specific T cells in-vitro and in-vivo. This new cell-based immunotherapeutic strategy could restore functional anti-viral immunity and clear the virus in chronic HBV patients.

Keywords: HBV; pDC; HBV-specific T cells; immunotherapy

Introduction

The Hepatitis B virus (HBV), a non-cytopathic hepatotropic DNA virus causing acute and chronic infections[1] remains a global health problem as around 20% of chronic HBV patients will evolve towards fatal cirrhosis and hepatocellular carcinoma[2]. Current treatments are based on antiviral drugs such as interferon-α and nucleoside/nucleotide analogues inhibiting the viral reverse transcriptase[3]. Despite efficient suppression of viral replication upon long term treatment and reduction of hepatic symptoms, viral cccDNA often persists in hepatocytes and, combined to viral escape mechanisms[4], may cause relapse of the disease. Anti-viral therapies are not able to definitively eradicate the virus.

HBV physiopathology appears to be strongly related to the host immunity[5,6]. Patients able to clear the virus elicit vigorous and efficient multi-specific T-cell responses, whereas patients who evolve towards chronic infection are characterized by weak and inadapted immune responses[7-9]. Most patients who recover from HBV infection developed efficient cellular responses directed towards epitopes located within the major HBV proteins[10], the nucleoscapsid HBc[11], the surface HBs[12] and the polymerase pol[13]. In particular, HBc-specific cytotoxic T cells play a critical role in the control and clearance of the virus[8,14] as they are the only effectors able to lyse persistently infected hepatocytes, clear the virus and resolve the infection. Moreover, it has been demonstrated in a mouse model that HBc-specific CD8 T cells are also key cellular effectors mediating HBV clearance from the liver[15]. Importantly resolution of chronic HBV infection has been achieved in patients upon adoptive transfer of immunity to HBc antigen[16]. Furthermore reversing T-cell exhaustion frequently observed in chronic patients[17] such as blocking PD-1 pathway[18] could recover functional anti-viral immunity. Thus restoring functional anti-HBV immunity could be a promising immunotherapeutic approach.

Different strategies are currently developed to fulfill HBV-specific cellular immune responses such as HBV DNA vaccine[19, 20], lipopeptide vaccine[21] and HBc or HBs peptide-pulsed

myeloid dendritic cells (mDC)[22]. Genetic engineering has also been designed to redirect effector T-cell specificity by either transduction with a TcR specific for the immunodominant HLA-A*0201-restricted HBc_{18-27} epitope[23] or expression of a chimeric antigen receptor[24]. On the opposite of anti-viral strategies, most immunotherapeutic approaches have not reached a clinical relevance yet. In addition their pre-clinical development is limited by the lack of in vivo models allowing addressing their efficacy in the context of a human immune system[25].

Surprisingly the plasmacytoid dendritic cells (pDCs) which are unique cells specialized in launching anti-viral responses[26-28] have not been used yet to stimulate anti-viral responses against HBV virus. Indeed pDCs play a crucial role in immunity to viruses due to their ability to detect the presence of single stranded RNA and CpG DNA, subsequently produce large quantities of type I IFN and induce adaptive immune responses. pDCs can cross-present viral antigens[29-30], induce virus-specific adaptive immune responses in vitro[31] and are essential to the induction of CTL in vivo following viral infection[32].

We have developed a new strategy using a unique human pDC cell line established from leukaemic HLA-A*0201^{+} pDCs that shared phenotypic and functional features of primary pDCs[30,33] and exploited its ability to promote immune responses towards specific antigens. We have well demonstrated the potential of the irradiated peptide-loaded pDCs to induce tumor-specific responses in HLA-A*0201 matched settings and their efficiency as anti-tumor vaccines in an active immunotherapeutic strategy for melanoma[34]. We investigated here the potential of pDCs in triggering anti-viral immunity against HBV using the pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted immunodominant peptides derived from HBc and HBs antigens and we established a unique Hepato-HuPBL humanized mouse model to address the therapeutic potential of the strategy in vivo. We demonstrated the ability of the pDC line to elicit functional HBV-specific immune responses able to specifically lyse infected hepatocytes both ex-vivo from chronic HBV patients and in vivo upon vaccination of Hepato-HuPBL mice. This new immunotherapeutic strategy could restore a functional anti-viral immunity and clear the virus in chronic HBV patients.

Experimental procedures

HBV patients

Ninety-four HLA-A*0201^{+} chronic HBV-infected patients and one resolved control who signed informed consent forms were studied. HBV patients were classified as inactive carriers (HBeAg-negative, HBV DNA < 2.000 IU/ml and permanently normal ALT for at least one year), HBeAg-negative hepatitis and HBeAg-positive hepatitis. Forty-eight patients were treated (entecavir or tenofovir) and 83% had undetectable HBV DNA. Criteria for exclusion included HIV, HCV, HDV co-infection, other liver diseases, and current treatment by interferon-alpha or immunosuppressive agents. Clinical parameters are summarized in Table 1. PBMCs were purified by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Eurobio). Excess liver tissues not needed for diagnosis purposes were obtained from 6 HLA-A*0201^{+} chronic HBV patients and processed to make cell suspensions.

PBMC and pDC line

Human PBMC were obtained from HLA-A*0201^{+} healthy donors by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Eurobio). The human pDC line GEN2.2 was obtained from leukaemic pDC and cultured as previously described[33]. This study was conducted under a procedure approved by the French Blood Agency Institutional Review Board. All donors signed informed consent forms.

Cell lines and reagents

The human HLA-A*0201^{+} hepatocyte cell lines HepG2 and HepG22.15 (HepG2 transfected with HBV DNA) were kindly provided by Dr F. Zoulim (Inserm U871, Lyon, France). HepG2 was cultured in DMEM supplemented with 10%FCS, 50UI/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen), 1mM sodium pyruvate (Sigma) and HepG22.15 cultured in William's E medium supplemented with 10%FCS, 50UI/ml penicillin/streptomycin, 2mM Glutamine (Invitrogen), 5µg/ml insulin (Sigma) and 5.10^{-5} hydrocortisone hemisuccinate (Roche). All other cultures were performed in RPMI1640-Glutamax supplemented with 1% non-essential amino-acids,

100µg/ml gentamycin, 10%FCS (Invitrogen) and 1mM sodium pyruvate (Sigma). T2 and K562 lines were purchased from ATCC (LGC Standards). Anti-human CD45, CD3, CD8 Abs were purchased from Beckman, HLA-A2 and PD1 Abs from BD. $FoxP3^{+}CD25^{+}CD4$ regulatory T cells were evaluated using the Human Regulatory T cell Staining kit (eBiosciences).

Peptides and tetramers

We used the following viral-derived HLA-A*0201-restricted peptides (NeoMPS) and the corresponding iTag HLA-A*0201 tetramers (Beckman): HBc_{18-27} (FLPSDFFPSV) from HBV core protein, $HBs_{335-343}$ (WLSLLVPFV) from HBV surface protein, $pol_{575-583}$ (FLLSLGIHL) from HBV polymerase and $FluM1_{58-66}$ (GILGFVFTL) from the influenza matrix protein.

Specific T-cell response induction in vitro

The pDC line was first loaded with peptides of interest as previously described[34]. PBMC were co-cultured with peptide-loaded pDCs at a 1:10 ratio in RPMI 10%FCS and weekly restimulated with peptide-loaded pDCs and 200UI/ml IL-2 (Proleukine, Chiron). In some experiments, PBMC were directly stimulated with the peptide alone (1-10µM final) for 10days. Viability and cell count were assessed by Trypan-blue exclusion. Specific CD8 T-cell responses were measured by tetramer labelling and analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur and CellQuest software (BD). Amplification of the absolute numbers of specific T cells was calculated by dividing the absolute number of specific T cells at d14 by the one at d0.

In vitro functional assays

CD107 surface expression by HBV-specific CD8 T cells

T cells were first labelled with iTAg HLA-A*0201 tetramer PE for 30min at RT, washed and restimulated with peptide-pulsed T2 cells (10:1 ratio) for 5h30. anti-CD107a and CD107b FITC antibodies (10µl/1.10^{6}cells) (BD) were added in the medium at the beginning of the

restimulation in presence of GolgiSTOP (0.67µl/ml) for the last 4h. Cells were then labelled with anti-CD3 PC7 and anti-CD8 APC antibodies.

^{51}Cr cytotoxicity assay

Antigen-specific cytotoxic activity was measured by performing a standard ^{51}Cr release assay. Effector T cells were sorted from the co-culture using an EasySep human T-cell enrichment kit (StemCell). Target cells (peptide-pulsed T2 cells, K562) were labelled with 50µCi for 1h at 37°C, washed and plated with effector T cells at the indicated E:T ratio in 96-well plates. Radioactivity was measured 4h later on supernatants on a microplate scintillation counter Top-Count-NXT (PerkinElmer). The mean of triplicate measurements was expressed as a percentage of specific lysis using the formula: (sample release–spontaneous release)/(maximal release–spontaneous release)x100.

CFSE-based cytotoxic assay towards human infected hepatocytes

Cytotoxicity of HBV-specific T cells was measured on the human infected hepatocyte cell line. HepG2 (control target) and HepG22.15 (specific target) cells were first labelled with respectively low (0.1µM) and high (2.5µM) CFSE level (Invivogen), mixed and cultured for 24h with HBV-specific T cells elicited by the pDCs or in control conditions. Cell suspensions were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur and CellQuest software (BD). The percentage of specific lysis was calculated using the formula: % normalized lysis = 1-(R1/R2)*100 with R1= %specific target / %control target after incubation with effectors and R2= %specific target / % control target in absence of effectors.

In-vivo functional assays in humanized mice

HuPBL mice were constructed by transplanting intraperitoneally 50.10^6 PBMC from a resolved HLA-A*0201$^+$ HBV patient into sublethally irradiated (100-120cGy) immunodeficient NOD-SCIDβ_2m$^{-/-}$ mice (NOD.Cg-Prkdc$^{SCID}\beta_2$m^{Tm1Unc}/J, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Bar Harbor, USA). Mice were further vaccinated with 5.10^6 irradiated HBc/HBs peptide-pulsed pDCs by intraperitoneal or subcutaneous routes once a week. Response to

vaccination was analysed in blood, peritoneal lavage, spleen and lymph nodes. Organs were digested 30min at 37°C with 2mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics). Resultant cell suspensions were stained with iTAg HLA-A*0201 tetramer, CD45, CD3, CD8 Abs and submitted to flow cytometry analysis. To assess therapeutic efficiency, 25.10^6 human hepatocyte cell lines (HepG2 or HepG22.15) were implanted subcutaneously into the flank of the humanized mice 3days after the first vaccination. Tumor size was monitored every 2-3days and tumor volume calculated using the formula: $(\text{short diameter})^2 \times \text{long diameter}/2$. Viral load was measured in the serum of the Hepato-HuPBL mice by real-time PCR on a LightCycler (Roche) using HBV-detection kit (Roche). To analyse specific T cells at the tumor site, tissues were digested and cell suspensions were submitted to tetramer labelling and flow cytometry analysis. This study was carried out in strict accordance with European Union guidelines for the handling of laboratory animals (86/609/CEE) and the French National Chart guidelines. The protocols were approved by the local Ethic Committee for Animal Experimentation of Grenoble (ComEth).

Statistical analysis

The statistical analyses were performed by using Mann-Whitney non parametric U-test, Wilcoxon matched paired test and unpaired t-test using Prism software.

Results

Human HLA-matched allogeneic pDCs induce strong HBc-specific T-cell responses ex-vivo from chronic HBV patients PBMC and LIL

To investigate the ability of the pDC line to trigger HBc-specific T cells, PBMC (n=94) and LIL (n=6) were purified from HLA-A*0201^{+} chronic HBV patients and stimulated once a week with the irradiated pDC line loaded with the HLA-A*0201-restricted HBc peptide. In respectively 45.8% and 66.6% of cases for PBMC and LIL, we obtained a potent amplification of the HBc-specific T cells as detected by tetramer labeling (Figure 1). We therefore distinguished two groups of patients, the “responders” able to respond to the HBc-loaded pDC stimulation, and the “non-responders” unable to amplify HBc-specific T cells upon stimulation (level of HBc-specific T cells at d14 <0.24%). In the responder group, the level of HBc-specific T cells reached averages of 3.2% (range 0.24-23.1%) for PBMC and 16.6% (range 4.5-76.1%) for LIL in 14 days of culture. Thus the pDC line elicits strong HBc-specific T-cell responses ex-vivo from one part of chronic HBV patients.

Non-response to pDC stimulation is related to presence of HBe antigen and high level of regulatory T cells

We further investigated the basis for responsiveness of chronic HBV patients to the HBc-loaded pDC stimulation. We first analyzed whether this difference was specific of the HBc antigen. By stimulating PBMC of healthy donors or chronic HBV patients with the pDC loaded with the HLA-A*0201-restricted Flu peptide, we obtained a significant higher amplification of Flu-specific T cells in healthy donors and the responder group compared to the non-responder group of chronic HBV patients (Figure 2A). By contrast, the global proliferative potential was similar between the groups (Supplementary Figure 1A). We then investigated if the level of regulatory T cells (Treg) in periphery could affect the response to the HBc-loaded pDC stimulation. Interestingly, the percentage of FoxP3^{+}CD25^{+}CD4^{+}

regulatory T cells within unstimulated PBMC was found at a higher level in the non-responder compared to the responder group of chronic HBV patients (Figure 2B), suggesting a relationship between the presence of Treg and the unability to respond to the pDC stimulation. Finally we examined the ability to respond to the HBc-loaded pDC stimulation within the different subgroups of patients (Figure 2C). We observed that HBc-specific T cell response was much greater in inactive carriers and treated or untreated HBeAg-negative hepatitis patients compared to treated or untreated HBeAg-positive patients. The difference appeared clearly significant after pooling patients according to the sole HBeAg status (Figure 2D). By contrast, HBV DNA levels, ALT and antiviral treatment had no significant impact on response to pDC (Supplementary Figures 1B, 1C and 1D). This interesting observation appeared to be highly relevant in the context of two patients in whom the HBeAg status changed at 6 months interval. First, the only HBeAg-positive patient unexpectively able to respond to the pDC stimulation achieved HBeAg loss followed by HBe seroconversion 6 months later (Supplementary Figure 2A). Secondly, one treated HBeAg-negative patient initially able to respond to the HBc-loaded pDC stimulation became irresponsive 6 months later during a transient HBeAg positivation (Supplementary Figure 2B) Thus the HBeAg status and the level of regulatory T cells distinguish responders from non-responders chronic HBV patients to the pDC stimulation.

The peptide-loaded pDC is more efficient than the peptide alone to elicit HBc-specific T cells

We then assessed the potential of our stimulation strategy compared to simple peptide stimulation. We stimulated PBMC from responders chronic HBV patients either with the HBc-loaded pDCs or with the HBc peptide alone and compared the induction of HBc-specific T cells. We obtained a higher percentage of HBc-specific T cells (Figure 3A) and a better amplification of the absolute number of specific T cells (Figure 3B) upon stimulation with the

peptide-loaded pDCs compared to the peptide alone. Thus HBc-loaded pDCs are more efficient to trigger HBc-specific T cells from chronic HBV patients compared to HBc peptide alone.

The HBc-specific T cells elicited by the pDCs are functional and exhibited in vitro HLA-A*0201-restricted cytotoxic activity towards HBV infected hepatocytes

To investigate the functionality of the HBc-specific T cells elicited by the HBc-loaded pDCs in the responder group, we first examined the expression of PD-1, a marker of T cell exhaustion frequently observed on anti-viral T cells in the settings of chronic infection. Even after two stimulations with the peptide-loaded pDCs, we did not observe any expression of PD1 on the HBc-specific T cells (Supplementary Figure 3). We then analyzed the cytotoxic potential of the HBc-specific T cells by performing a ^{51}Cr release assay using peptide-loaded T2 cells as targets. HBc-specific T cells exhibited a strong cytotoxic activity towards T2 cells loaded with HBc but not with an irrelevant peptide (Figure 4A). Then we tested the ability of the HBc-specific T cells to lyse HBV-infected human HLA-A*0201^{+} hepatocytes using a CFSE assay. For all the tested patients, the HBc-specific T cells were able to specifically lyse the HBV infected human HLA-A*0201^{+} hepatocyte cell line HepG22.15 but not the uninfected HepG2 cell line (Figure 4B). We obtained 15-95% of specific lysis with T cells containing 0.99-23.1% of HBc-specific T cells. Furthermore when co-cultured with peptide-loaded T2 cells, HBc-specific T cells express CD107 only in the presence of HBc but not control peptide (Figure 4C). Thus the pDC line elicits fully functional HBc-specific T cells.

The HBc- and HBs-loaded pDC line elicited in-vivo HBV-specific T-cell responses in humanized mice

We further evaluated the capacity of the peptide-loaded pDCs to elicit virus-specific T-cell responses against HBV antigen in-vivo by using a humanized mouse model constructed by xenotransplanting PBMC into immunodeficient NOD-SCID$\beta_2m^{-/-}$ mice (HuPBL mouse model, Figure 5A). We used PBMC from a resolved HBV patient from whom we were able to elicit HBc- and HBs-specific T cells in vitro using the pDC line (Figure 5B). Treatment of the HuPBL mice with the irradiated HBc- and HBs-loaded pDC line led to the induction of HBc- and HBs-specific T cells at the site of immunization, in the draining lymph nodes but also in the circulation and spleen (Figures 5C and 5D). Thus the HBc- and HBs-loaded pDC line elicited widespread HBc- and HBs-specific T cell responses in-vivo.

Treatment with the HBc- and HBs-loaded pDCs protect Hepato-HuPBL mice against HBV infection

We next investigated the therapeutic potential of the pDC treatment in humanized mice further xenotransplanted with a HLA-A*0201$^+$ human hepatocyte cell line transfected with HBV. Immunodeficient NOD-SCID$\beta_2m^{-/-}$ mice were reconstituted with PBMC from a HLA-A*0201$^+$ resolved HBV patient and weekly treated with the irradiated pDC line loaded with HBc and HBs peptide or control peptide before being challenged with human hepatocyte cell lines transfected (HepG22.15) or not (HepG2) with HBV (Hepato-HuPBL mice, Figure 6A). The HBc- and HBs-loaded pDCs inhibited the development of the HepG22.15 cells compared to the control pDCs whereas the HepG2 cell development was similar in the two conditions (Figures 6B and 6C). Importantly the HBV viral load in the serum of Hepato-HuPBL mice treated with HBc- and HBs-loaded pDCs was significantly lower than in mice receiving the control pDCs (Figure 6D). Notably HBc- and HBs-specific T cells were found at the HepG22.15 site of treated Hepato-HuPBL mice (Figure 6E), suggesting that the HBV-

specific T cells induced by the pDCs were able to migrate to the site of virus expression and kill infected hepatocytes.

Discussion

Current anti-viral treatments for chronic HBV infection are not able to definitively clear the virus. The resolution of HBV infection would require the lysis of persistently infected hepatocytes or elimination of intrahepatic cccDNA by HBV-specific T cells. pDC are important antigen-presenting cells particularly in the context of infectious diseases. We demonstrate here that an irradiated pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted peptides can efficiently trigger functional HBV-specific T cell responses ex-vivo from HBe^{neg} chronic HBV patients and prove its efficacy in HBV clearance in-vivo using a unique Hepato-HuPBL mouse model.

From both PBMC and LIL of chronic HBV patients, high levels of functional HBc-specific T cells displaying efficient antigen-restricted functions and able to lyse HBV infected hepatocytes could be elicited by the irradiated peptide-pulsed pDC line. Eventhough intrahepatic HBV-specific T cells are known to be in an exhaustion state[18], the strong induction of specific T cells from LIL strengthened the potency of the pDC-based strategy. The peptide-loaded pDCs induced higher levels of specific T cells compared to peptide alone and faster immune response compared to mDCs, where similar level of HBc-specific T cells could be induced but upon 3 weeks of stimulation[22]. Virus-specific T-cell responses are thought to be responsible for both viral clearance and disease pathogenesis during HBV infection, therefore potentially restraining the use of such immunotherapies. Yet a strong cytotoxic response has been described in the absence of liver damage[7], and it has been demonstrated that the quantity of virus produced within hepatocytes influences the virus-specific CD8 T-cell function[35]. Regulating the viral load using antiviral drugs may allow controlling the balance between the cytotoxic and inflammatory effects of virus-specific T cells.

Interestingly we demonstrated that regulatory T cells and HBe antigen status are critical factors determining the ability of patients to elicit anti-HBV immune responses upon pDC stimulation. It has been suggested that regulatory T cells contribute to the impaired immune response in chronic HBV patients[36, 37] and may inhibit the expansion and function of HBc-specific cytotoxic T cells[38]. Besides, HBeAg is known to be immunoregulatory and to modulate the immune response to HBc antigen[39]. In accordance with our findings, it has been shown that an mDC-based vaccine pulsed with HBV-derived peptides elicited a stronger immunity to HBV in HBeAg-negative patients compared to HBeAg-positive patients[40]. Our observations confirm that HBeAg and regulatory T cells are also critical factors determining the success of immunostimulation with pDCs and should be taken into consideration for optimizing future approaches to HBV treatment. Moreover, our data supports the hypothesis that treatment with nucleoside/nucleotide analogues is not associated with reinforcement of anti-viral T cell responses.

In the aim to demonstrate the strong capacity of our approach in vivo we developed a new Hepato-HuPBL mouse model consisting in humanized mice engrafted with virus-producing hepatocyte cell line. Indeed the existing chimeric and transgenic models are not suitable for testing such immunotherapies that required both the context of a human immune system and HBV infected human hepatocytes. The trimera mouse model[41] and the human liver-uPA-SCID model further infected with HBV[42] are devoid of immune cells, the HBV transgenic mouse[43] is restricted to a murine context, and HLA-A2 transgenic mice[19, 44] allowed epitope discovery but not therapeutic testing due to the absence of the virus. Thanks to the Hepato-HuPBL mouse model we clearly showed that pDCs can in vivo elicit fully functional virus-specific T cells able to slow down the development of the infected hepatocyte line and importantly reduce dramatically the viral load. This model appears to be helpful to perform pre-clinical in-vivo studies of new immunotherapeutic approaches currently developed to fulfill HBV-specific cellular immune responses.

Altogether, these results lead us to postulate that a pDC-based strategy could represent an interesting new way to elicit HBV-specific immune responses due to its potent efficacy and simple design. On the contrary to autologous mDC-based vaccine that required patients' cells to generate the antigen-presenting cells, the pDC strategy could be directly apply to all HLA-A*0201^{+} patients and used as an active or adoptive immunotherapy. Both of these settings have already been tested in chronic HBV patients and proved to be safe[16,40]. A pDC-based strategy could be used in combination with anti-viral treatments that will lower the viral load and therefore limit the risk of liver damage. It has been shown that a restoration of specific T-cell responses could occur in this setting[45]. Interestingly a reduction of HBeAg load could be observed upon anti-viral treatments in some patients[46] and HBs seroconversion achieved following mDC-based vaccine[40].

This study demonstrates the ability of pDCs to efficiently stimulate potent viral-specific T cells in HBe^{neg} chronic HBV patients, contributes to the identification of critical factors for successful therapies, and establishes a unique pre-clinical model to test anti-HBV immunotherapeutic strategies. Following anti-viral therapies, the elimination of persistently infected hepatocytes remains a major therapeutic goal to cure chronic HBV infection. Our strategy, allowing restoring functional anti-HBV effectors critical for the control and clearance of the virus, provides the bases of the development of a potential novel immunotherapeutic approach for chronic HBV patients.

Figure legends

Figure 1. Induction of HBc-specific T cells from HLA-A*0201^{+} chronic HBV patients using the HBc-loaded pDC line in vitro. PBMC or LIL from chronic HBV patients were stimulated once a week by the pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted HBc peptide. HBc-specific T cells were analyzed by flow cytometry using HLA-A*0201 specific tetramers. (A) Tetramer labeling of HBc-specific T cells initially (d0) and at d7 and d14 of culture (dotplots gated on CD8 T cells). One representative responder and non-responder patient. (B) Evolution of the percentage of HBc-specific T cells obtained from PBMC of 94 chronic HBV patients (44 responders and 52 non-responders) (2 patients were performed twice, see Supplementary Figure 2) or (C) LIL of 6 patients (4 responders, 2 non-responders).

Figure 2. Level of regulatory T cells and HBe status distinguish responders from non-responders chronic HBV patients to pDC stimulation. (A) PBMC from healthy donors or chronic HBV patients were stimulated once a week by the pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted Flu peptide and cultured during 14days. Flu-specific T cells were analyzed using HLA-A*0201 specific tetramer at d14 of culture in healthy donors (n=20) and chronic HBV patients (28 responders and 28 non-responders to the pDC stimulation). (B) Analysis of FoxP3+CD25+CD4+ regulatory T cells by flow cytometry within unstimulated PBMC of chronic HBV patients (13 responders and 17 non-responders to the pDC stimulation). (C,D) PBMC were stimulated once a week by the pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted HBc peptide and cultured during 14days. HBc-specific T cells were analyzed using HLA-A*0201 specific tetramer. (C) The percentage of HBc-specific T cells at d0 and d14 of culture was measured in different subgroups of chronic HBV patients: inactive carrier, treated or untreated patients positive or negative for HBeAg (bars at mean). (D) Levels of HBc-specific T cells at d14 in HBe^{neg} and HBe^{pos} HBV patients.

Figure 3. Comparison of the induction of HBc-specific T cells from chronic HBV patients using peptide-loaded pDC line or peptide alone in vitro. PBMC from chronic HBV patients (n=9) were stimulated by the pDC line loaded with HBc peptide (1-10µM) or directly by the HBc peptide (1-10µM). HBc-specific T cells were analyzed by flow cytometry using HLA-A*0201 specific tetramer initially (d0) and at d10 of culture. (A) Percentage of HBc-specific T cells at d10 of culture. (B) Amplification of the absolute numbers of HBc-specific T cells from d0 to d10.

Figure 4. Functionality of the HBc-specific T cells elicited by the pDC cell line. PBMC were stimulated once a week by the pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted HBc peptide and cultured during 14days. (A) Cytotoxic activity of HBc-specific T cells was measured towards T2 cells loaded with HBc peptide or control peptide or K562 cells at different effector/target ratios by a ^{51}Cr release assay. One representative experiment (left panel) and pool of 8 experiments (right panel). (B) Cytotoxic activity of HBc-specific T cells was measured towards HBV infected human hepatocytes. HBc-specific T cells were incubated with a mix of CFSE^{low} labeled HepG2 and CFSE^{high} labeled HepG22.15 or in control condition and the percentage of each CFSE pic was measured by flow cytometry 24h later (upper panel). The percentage of specific lysis of HepG22.15 and absolute number of HBc-specific T cells were calculated for each patient (lower panel). (C) Expression of CD107 on the surface of the HBc-specific T cells measured after restimulation of HBc-specific T cells with T2 cells loaded with HBc peptide or a control peptide. One representative patient (upper panel) and data obtained with 10 patients (lower panel).

Figure 5. Induction of HBc- and HBs-specific T cells upon vaccination with the pDC line in-vivo in a humanized mouse model. (A) Immunodeficient NOD-SCIDβ2m$^{-/-}$ mice were humanized with PBMC from a resolved HLA-A*0201^{+} patient and treated with the pDC

loaded with HLA-A*0201 restricted HBc/HBs peptides once a week. (B) PBMC from the resolved HBV patient were stimulated once a week by the pDC line loaded with HLA-A*0201 restricted HBc and HBs peptides. HBc- and HBs-specific T cells were analyzed by flow cytometry using HLA-A*0201 specific tetramer initially and at d14 of culture (dotplots gated on CD8 T cells). Tetramer Pol was used as control. One representative experiment. (C,D) After two vaccinations, HBc- and HBs-specific T cells were analyzed by tetramer labeling on cell suspensions at the injection site, in the draining lymph nodes, spleen and blood. Tetramer Pol was used as control. (C) One representative HuPBL mice and (D) percentage of HBc- and HBs-specific T cells obtained from 11 vaccinated HuPBL mice.

Figure 6. Therapeutic efficacy of the pDC vaccine in-vivo in a humanized mouse model towards HBV infection. (A) Immunodeficient NOD-SCIDβ2 $m^{-/-}$ mice were humanized with PBMC from a resolved HLA-A*0201^{+} patient and vaccinated once a week with the pDC loaded with HLA-A*0201 restricted HBc and HBs peptides or Pol peptide as control. After one vaccination, HuPBL mice were transplanted subcutaneously with a human hepatocyte cell line infected (HepG22.15) or not (HepG2) with HBV. Hepato-HuPBL mice were followed during 15days after transplantation. (B) Evolution of the HepG2 or HepG22.15 growth. (C) Tumor size measured at d15. (D) Blood viral load measured at d15. Pool of two experiments with respectively 7 and 8 Hepato-HuPBL mice. (E) Analysis of HBc- and HBs-specific T cells at the tumor site by tetramer labeling (dotplots gated on CD8 T cells). Tetramer Pol was used as control. One representative Hepato-HuPBL mouse.

References

1. Deny P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. Pathol Biol (Paris) 2010;58:245-53.
2. Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 2009;15:3099-105.
3. Takkenberg RB, Weegink CJ, Zaaijer HL, et al. New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. Vox Sang 2010;98:481-94.
4. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. Gastroenterology 2009;137:1593-608 e1-2.
5. Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. Lancet Infect Dis 2002;2:43-50.
6. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. Annu Rev Pathol 2006;1:23-61.
7. Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. J Exp Med 2000;191:1269-80.
8. Webster GJ, Reignat S, Brown D, et al. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. J Virol 2004;78:5707-19.
9. Rehermann B, Lau D, Hoofnagle JH, et al. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. J Clin Invest 1996;97:1655-65.
10. Maini MK, Boni C, Ogg GS, et al. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. Gastroenterology 1999;117:1386-96.
11. Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, et al. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. J Exp Med 1991;174:1565-70.

12. Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, et al. HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. J Immunol 1993;150:4659-71.
13. Rehermann B, Fowler P, Sidney J, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. J Exp Med 1995;181:1047-58.
14. Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, et al. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. J Clin Immunol 2003;23:223-32.
15. Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:798-802.
16. Lau GK, Suri D, Liang R, et al. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. Gastroenterology 2002;122:614-24.
17. Das A, Hoare M, Davies N, et al. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. J Exp Med 2008;205:2111-24.
18. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. Gastroenterology 2010;138:682-93, 693 e1-4.
19. Loirat D, Lemonnier FA, Michel ML. Multiepitopic HLA-A*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. J Immunol 2000;165:4748-55.
20. Depla E, Van der Aa A, Livingston BD, et al. Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. J Virol 2008;82:435-50.
21. Livingston BD, Crimi C, Grey H, et al. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. J Immunol 1997;159:1383-92.

22. Chen W, Shi M, Shi F, et al. HBcAg-pulsed dendritic cell vaccine induces Th1 polarization and production of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. Hepatol Res 2009;39:355-65.
23. Gehring AJ, Xue SA, Ho ZZ, et al. Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. J Hepatol 2010;55:103-10.
24. Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. Gastroenterology 2008;134:239-47.
25. Zoulim F, Berthillon P, Guerhier FL, et al. Animal models for the study of HBV infection and the evaluation of new anti-HBV strategies. J Gastroenterol Hepatol 2002;17 Suppl:S460-3.
26. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. Semin Immunol 2005;17:253-61.
27. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, et al. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. Annu Rev Immunol 2011;29:163-83.
28. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol 2004;5:1219-26.
29. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. Immunity 2008;29:352-61.
30. Lui G, Manches O, Angel J, et al. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. PLoS One 2009;4:e7111.
31. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. Blood 2003;101:3520-6.
32. Schlecht G, Garcia S, Escriou N, et al. Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation. Blood 2004;104:1808-15.
33. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. J Immunol 2006;176:248-55.

34. Aspord C, Charles J, Leccia MT, et al. A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. PLoS One 2010;5:e10458.
35. Gehring AJ, Sun D, Kennedy PT, et al. The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. J Virol 2007;81:2940-9.
36. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 2005;41:771-8.
37. Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. J Immunol 2006;177:739-47.
38. Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, et al. Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. J Virol 2005;79:3322-8.
39. Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, et al. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:14913-8.
40. Luo J, Li J, Chen RL, Nie L, et al. Autologus dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: a pilot, open label, clinical trial in human volunteers. Vaccine 2010;28:2497-504.
41. Ilan E, Arazi J, Nussbaum O, et al. The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. J Infect Dis 2002;185:153-61.
42. Meuleman P, Leroux-Roels G. The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. Antiviral Res 2008;80:231-8.
43. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. Curr Top Microbiol Immunol 1996;206:149-73.
44. Shi TD, Wu YZ, Jia ZC, et al. Therapeutic polypeptides based on HBcAg(18-27) CTL epitope can induce antigen-specific CD(8)(+) CTL-mediated cytotoxicity in HLA-A2 transgenic mice. World J Gastroenterol 2004;10:1222-6.

45. Boni C, Penna A, Bertoletti A, et al. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B. J Hepatol 2003;39:595-605.
46. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. Hepatology 2007;45:507-39.

Supplementary Figure legends

Supplementary figure 1. Proliferative potential and clinical parameters of responders and non responders chronic HBV patients. (A) PBMC from healthy donors (n=5) and chronic HBV patients (5 responders and 5 non responders) were cultured for 5 days in presence of PHA or OKT3 and proliferation was measured using a 3H-thymidine assay. (B,C) Comparison of clinical parameters of chronic HBV patients between responders and non responders to pDC stimulation. (B) Blood viral load, (C) ALT level in blood. (D) Comparison of levels of HBc-specific T cells at d14 between untreated and treated HBV patients.

Supplementary figure 2. Evolution of HBe antigen status and response to the pDC stimulation for two chronic HBV patients. PBMC were stimulated once a week with the pDC cell line loaded with HLA-A*0201-restricted HBc peptide and cultured for 14 days. HBc-specific T cells were analyzed by flow cytometry using HLA-A*0201 specific tetramer at d0 and d14 (dotplots gated on CD8 T cells) for two different blood samplings taken at 6 months interval for each patient. (A) Patient with an HBeAg status positive for the first sampling but negative for the second. (B) Patient with an HBeAg status negative for the first sampling but positive for the second.

Supplementary figure 3. PD1 expression by HBc-specific T cells. PBMC were stimulated once a week by the pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted HBc peptide. Expression of PD1 was assessed on HBc-specific T cells at d14 of culture.

Tables

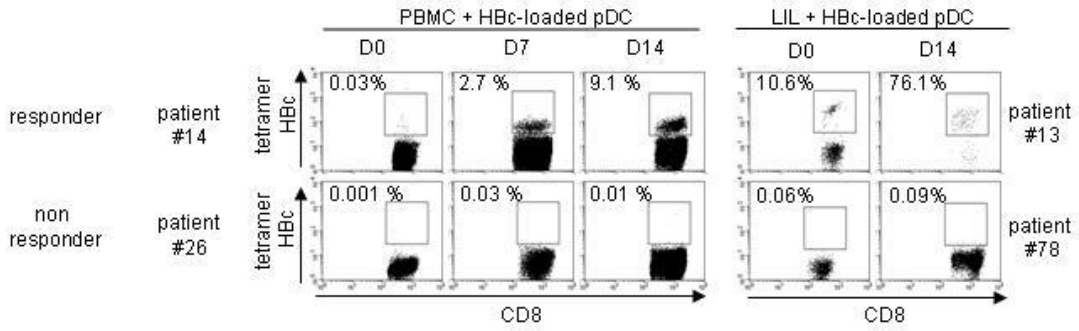
Table 1

Clinical characteristics of the different subgroups of chronic HBV patients used in the study

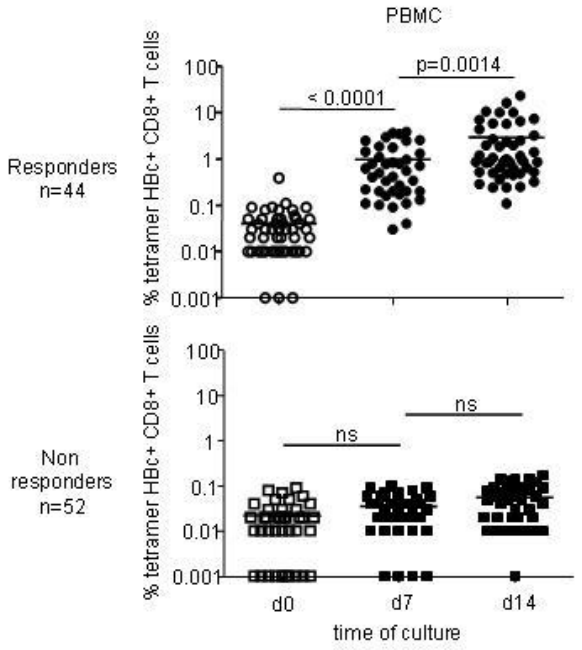
Patients characteristics	Inactive carriers	Untreated chronic HBV patients HBe-	Untreated chronic HBV patients HBe+	Treated HBV patients HBe-	Treated HBV patients HBe+
N =	17	24	5	42	6
Age (Years)	45±9	43±13	31±10	55±13	49±21
Sex (% M/W)	59/41	65/35	60/40	71/29	83/17
Viral load (IU/ml)	32±68	$4.6x10^6$±$22.4x10^6$	$72.4x10^6$±$106.1x10^6$	719±4565	1490±3455
ALT level (IU/ml)	22±15	44±31	217±400	35±22	49±23
Cirrhosis (%)	0	0	0	7.1	16.7
Hbe antigen status	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive

Figure 1

A


PBMC + HBc-loaded pDC
LIL + HBc-loaded pDC
D0
D7
D14
D0
D14
responder
patient #14
tetramer HBc
0.03%
2.7 %
9.1 %
10.6%
76.1%
patient #13
non responder
patient #26
0.001 %
0.03 %
0.01 %
0.06%
0.09%
patient #78
CD8
CD8

B


PBMC
Responders n=44
Non responders n=52
% tetramer HBc+ CD8+ T cells
< 0.0001
p=0.0014
ns
ns
100
10
1
0.1
0.01
0.001
d0
d7
d14
time of culture

C

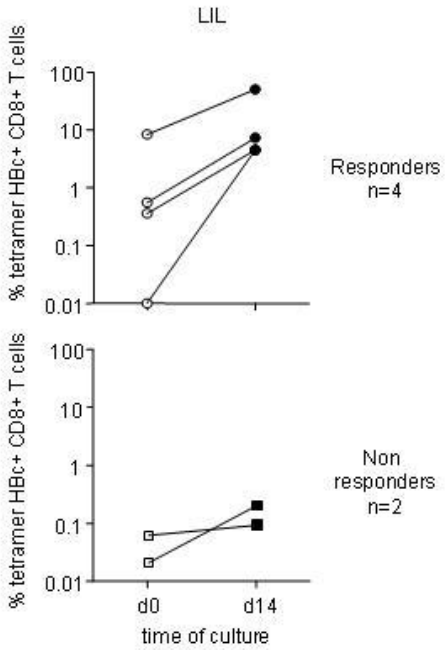

LIL
Responders n=4
Non responders n=2
% tetramer HBc+ CD8+ T cells
100
10
1
0.1
0.01
d0
d14
time of culture

Figure 2

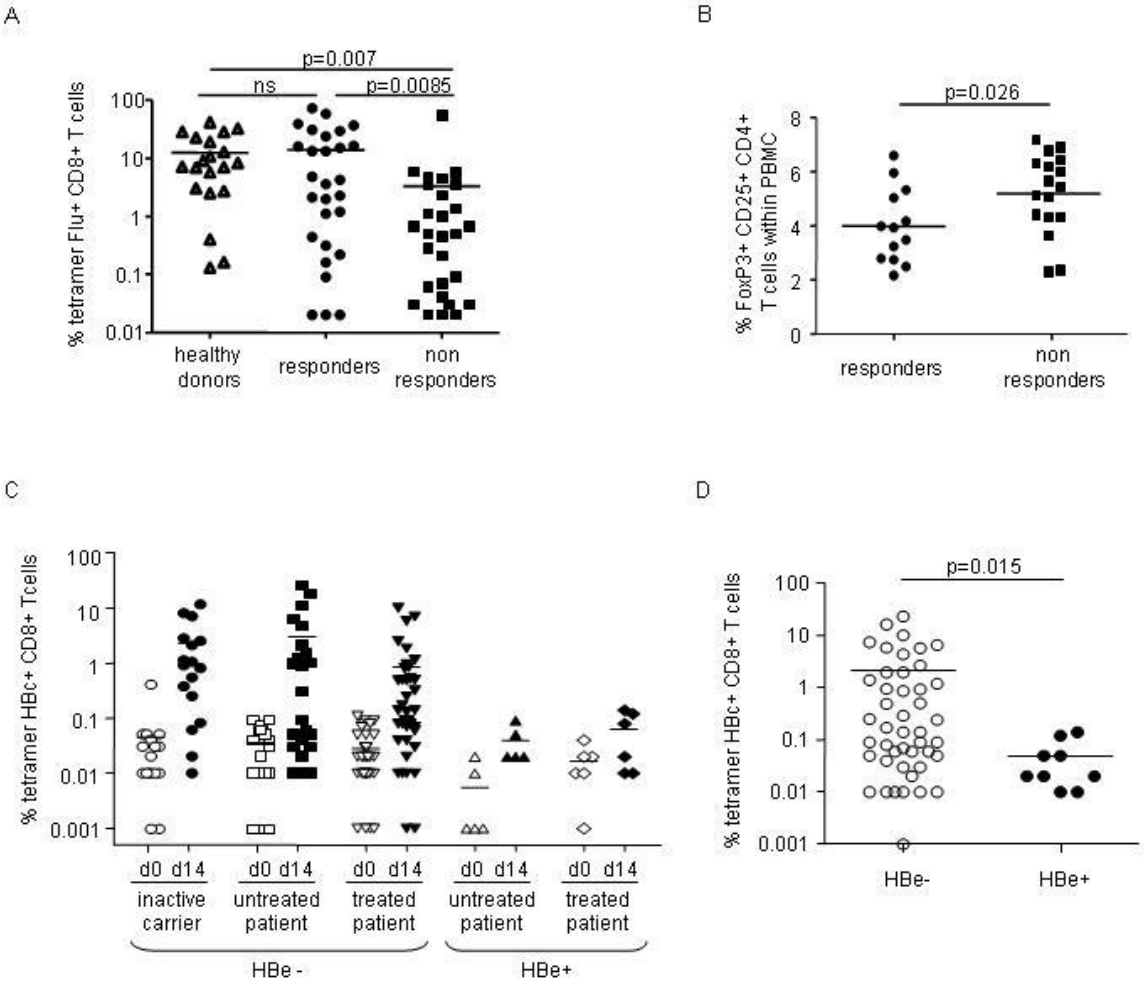

A
p=0.007
ns
p=0.0085
% tetramer Flu+ CD8+ T cells
100
10
1
0.1
0.01
healthy donors
responders
non responders
B
p=0.026
% FoxP3+ CD25+ CD4+ T cells within PBMC
8
6
4
2
0
responders
non responders
C
% tetramer HBc+ CD8+ Tcells
100
10
1
0.1
0.01
0.001
d0 d14
inactive carrier
untreated patient
treated patient
untreated patient
treated patient
HBe -
HBe+
D
p=0.015
% tetramer HBc+ CD8+ T cells
100
10
1
0.1
0.01
0.001
HBe-
HBe+

Figure 3

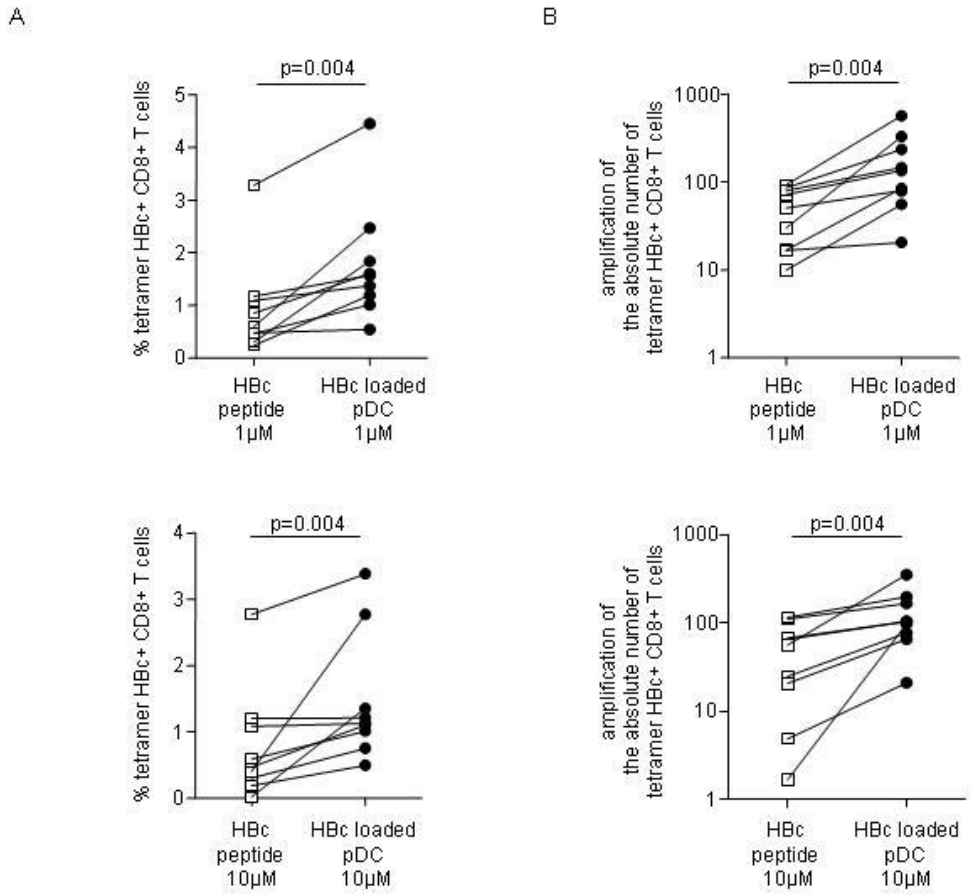

A
B
p=0.004
% tetramer HBc+ CD8+ T cells
amplification of the absolute number of tetramer HBc+ CD8+ T cells
HBc peptide 1µM
HBc loaded pDC 1µM
HBc peptide 10µM
HBc loaded pDC 10µM

Figure 4

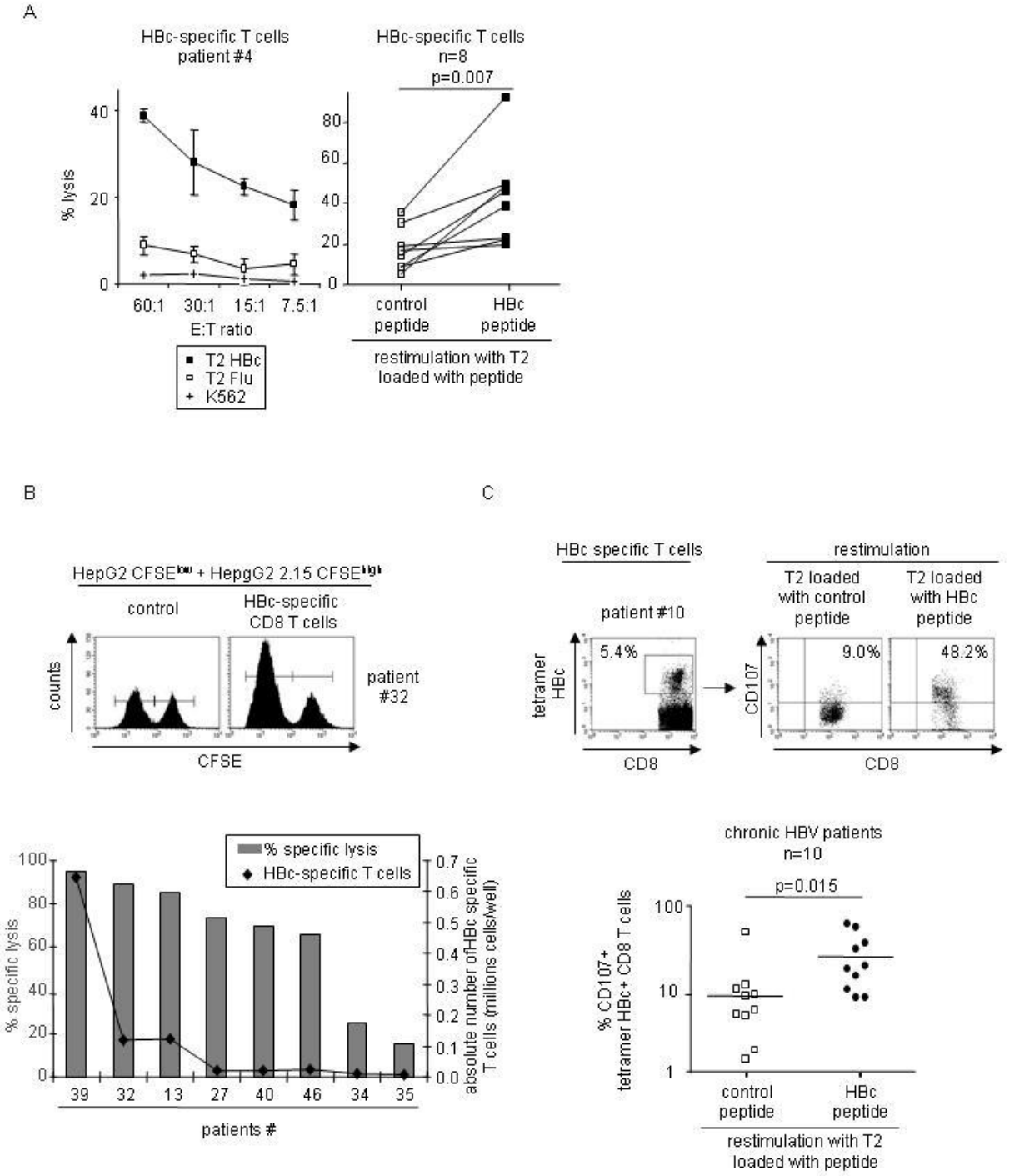
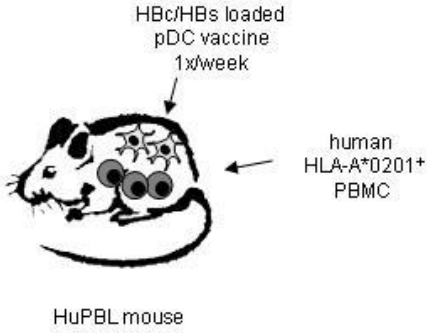
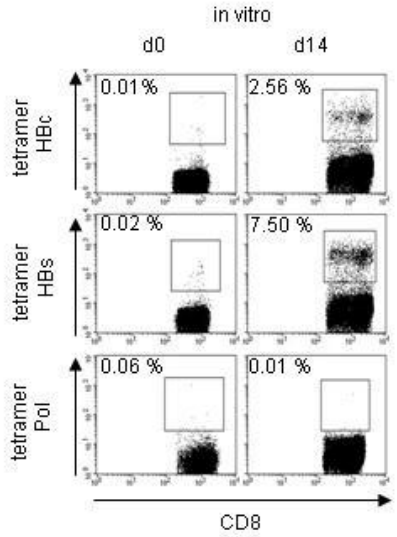

A
HBc-specific T cells
patient #4
% lysis
E:T ratio
60:1
30:1
15:1
7.5:1
T2 HBc
T2 Flu
K562
HBc-specific T cells
n=8
p=0.007
control peptide
HBc peptide
restimulation with T2 loaded with peptide
B
HepG2 CFSE low + HepgG2 2.15 CFSE high
control
HBc-specific CD8 T cells
counts
CFSE
patient #32
% specific lysis
HBc-specific T cells
absolute number of HBc specific T cells (millions cells/well)
patients #
C
HBc specific T cells
restimulation
T2 loaded with control peptide
T2 loaded with HBc peptide
patient #10
tetramer HBc
CD8
CD107
5.4%
9.0%
48.2%
chronic HBV patients
n=10
p=0.015
% CD107+ tetramer HBc+ CD8 T cells
control peptide
HBc peptide
restimulation with T2 loaded with peptide

Figure 5

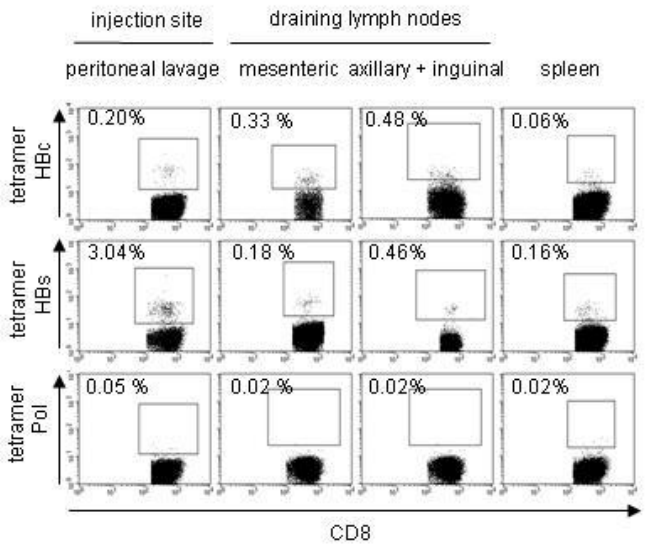
A



B



C



D

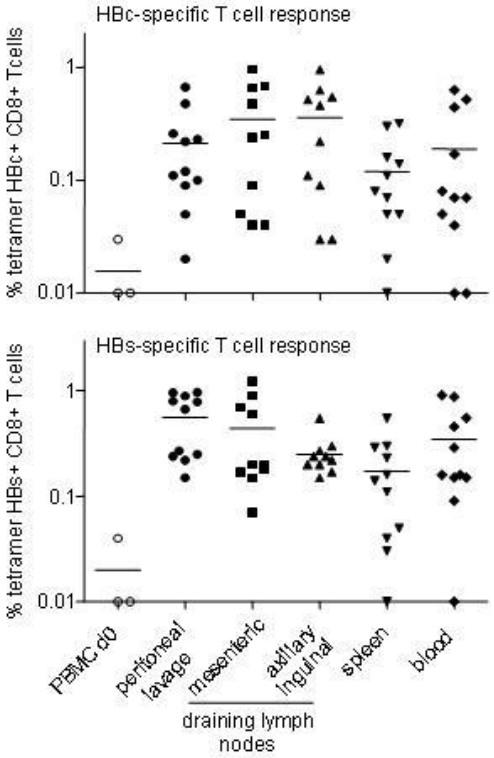
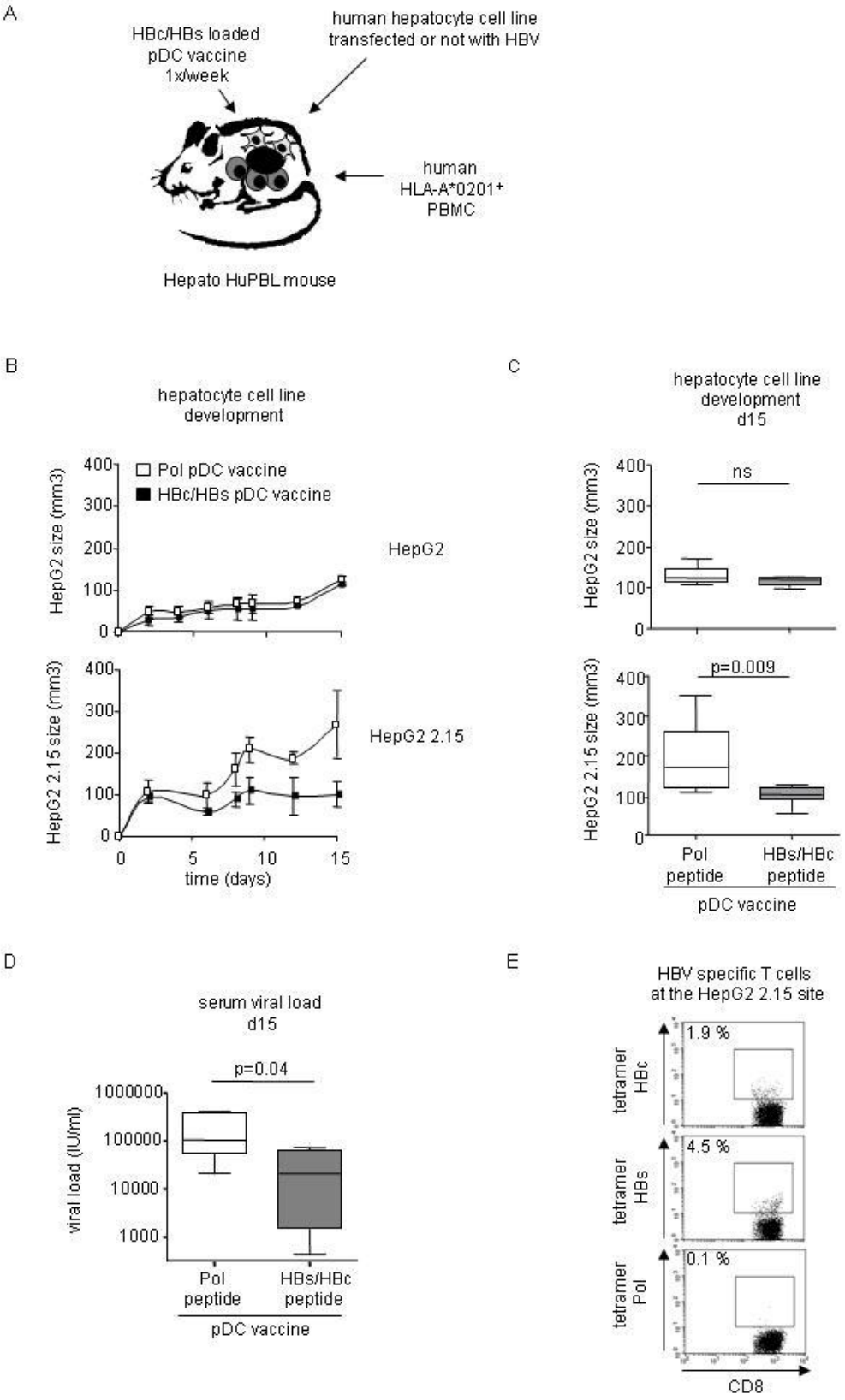
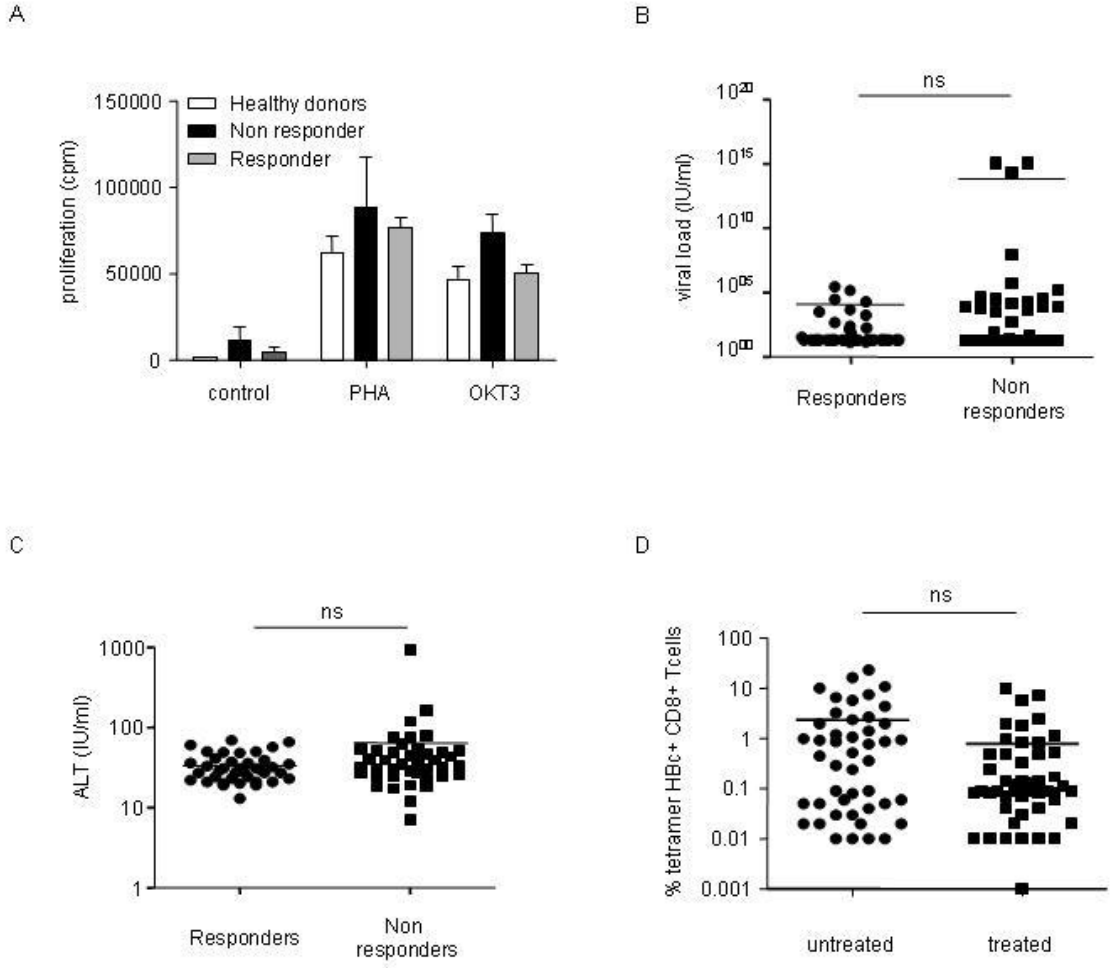


Figure 6

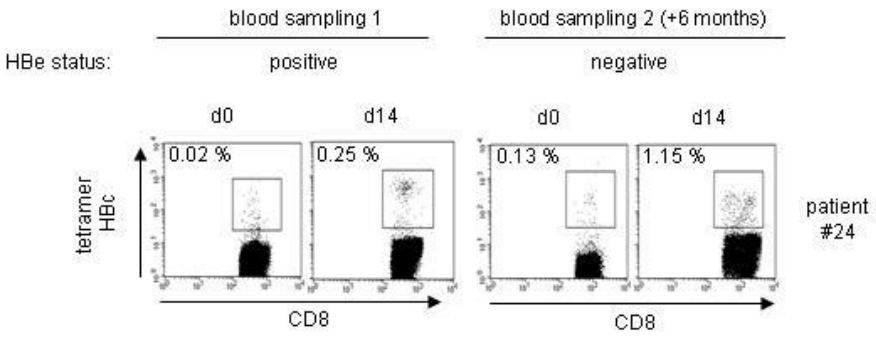

A
HBc/HBs loaded
pDC vaccine
1x/week
human hepatocyte cell line
transfected or not with HBV
human
HLA-A*0201+
PBMC
Hepato HuPBL mouse
B
hepatocyte cell line
development
Pol pDC vaccine
HBc/HBs pDC vaccine
HepG2 size (mm3)
HepG2
HepG2 2.15 size (mm3)
HepG2 2.15
time (days)
C
hepatocyte cell line
development
d15
ns
p=0.009
Pol
peptide
HBs/HBc
peptide
pDC vaccine
D
serum viral load
d15
p=0.04
viral load (IU/ml)
Pol
peptide
HBs/HBc
peptide
pDC vaccine
E
HBV specific T cells
at the HepG2 2.15 site
tetramer HBc
1.9 %
tetramer HBs
4.5 %
tetramer Pol
0.1 %
CD8

Supplementary figure 1

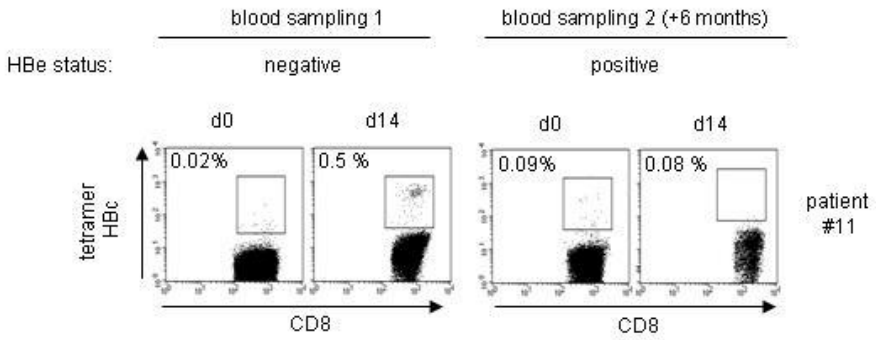


Supplementary figure 2

A



B



THESE SOUTENUE PAR : Mr Martinet Jérémie

TITRE : Potentiel immuno-thérapeutique des pDCs dans l'hépatite B chronique.

CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons pu démontrer, ex vivo à partir de prélèvements sanguins et hépatiques de patients atteints d'hépatite B chronique, la capacité de la lignée de pDC à restaurer une immunité antivirale fonctionnelle en contexte HLA-A2 restreint. La lignée de pDC est ainsi capable d'amplifier chez certains patients « répondeurs » à partir de PBMC et de LIL des lymphocytes T CD8 cytotoxiques spécifiques des antigènes HBc et HBs et fonctionnels, capables d'éliminer les hépatocytes infectés.

De plus, nous avons pu observer dans un modèle de souris immunodéficientes, humanisées, reconstituées avec des PBMC et transplantées avec des hépatocytes transfectés avec le VHB, que la lignée de pDC était capable d'induire des lymphocytes T CD8 cytotoxiques spécifiques du VHB in vivo. Ces lymphocytes T sont capables de lyser spécifiquement les hépatocytes infectés par le virus et de réduire la charge virale dans la souris.

Néanmoins, chez un certain nombre de patients « non répondeurs », la lignée de pDC n'a pas permis l'amplification de lymphocytes T CD8 spécifiques ex vivo. Nous avons ainsi pu observer que la présence de l'antigène HBe ou d'un fort taux de cellules T régulatrices chez ces patients était associée à une non-réponse

à la stimulation par la lignée de pDC. Les mécanismes par lesquels ces éléments sont capables d'inhiber la stimulation par la pDC nécessitent d'être étudiés afin de pouvoir mieux comprendre les capacités d'échappement du virus à l'immunité

La lignée de pDC pulsée et irradiée pourrait donc être utilisée comme immunothérapie contre le VHB afin de restaurer une immunité fonctionnelle qui, contrairement aux thérapeutiques antivirales classiques, bien qu'induisant une disparition de la charge virale, ne sont pas capables de contrôler définitivement le virus. Pour cela il serait nécessaire d'étudier l'influence de la lignée de pDC sur la réponse lymphocytaire B, autre élément essentiel de l'immunité anti-HBV.

Enfin, le transfert clinique de cette stratégie nécessiterait d'étudier les risques cytotoxiques de la réactivation d'une immunité spécifique contre le VHB afin d'établir un protocole d'administration utilisable en clinique avec le moins d'effets indésirables possibles.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 28/9/2011

LE DOYEN

Professeur Christophe RIBUOT

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER U.F.R. DE PHARMACIE GRENOBLE 1

LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Michel Seve

Bibliographies:

1. Deny P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. Pathol Biol (Paris) 2010;58:245-53.
2. Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 2009;15:3099-105.
3. Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. Proc Natl Acad Sci U S A 1975;72:4597-601.
4. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet 1970;1:695-8.
5. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). N Engl J Med 1976;295:1168-75.
6. Ganem D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. Curr Top Microbiol Immunol 1991;168:61-83.
7. Takahashi K, Machida A, Funatsu G, Nomura M, Usuda S, Aoyagi S, Tachibana K, Miyamoto H, Imai M, Nakamura T, Miyakawa Y, Mayumi M. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. J Immunol 1983;130:2903-7.
8. Benhenda S, Cougot D, Buendia MA, Neuveut C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. Adv Cancer Res 2009;103:75-109.
9. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell 1982;29:403-15.
10. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. J Hepatol 2009;51:581-92.
11. Pollack JR, Ganem D. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. J Virol 1994;68:5579-87.
12. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. Cell 1986;47:451-60.
13. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. Annu Rev Pathol 2006;1:23-61.
14. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 1995;13:29-60.
15. Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, Williams R, Dusheiko G, Bertoletti A. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in

patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. J Virol 2004;78:5707-19.
16. Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. J Exp Med 2000;191:1269-80.
17. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. Immunity 1996;4:25-36.
18. Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertoletti A. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. Gastroenterology 1999;117:1386-96.
19. Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. J Exp Med 1991;174:1565-70.
20. Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, Hata H, Nakayama E, Shiratori Y. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. J Clin Immunol 2003;23:223-32.
21. Brown JL, Carman WF, Thomas HC. The hepatitis B virus. Baillieres Clin Gastroenterol 1990;4:721-47.
22. Wang L, Lin SJ, Tsai JH, Tsai CH, Tsai CC, Yang CC. Anti-hepatitis B surface antigen IgG1 subclass is predominant in individuals who have recovered from hepatitis B virus infection, chronic carriers, and vaccinees. Med Microbiol Immunol 2005;194:33-8.
23. Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. J Viral Hepat 2002;9:243-57.
24. Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. Lancet Infect Dis 2002;2:43-50.
25. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. Curr Top Microbiol Immunol 1996;206:149-73.
26. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghrayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. J Virol 2003;77:68-76.

27. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 2002;347:168-74.
28. Milich DR, Schodel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. J Virol 1997;71:2192-201.
29. Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, Hughes J, Milich DR. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:14913-8.
30. Brunetto MR, Giarin M, Oliveri F, Saracco G, Barbera C, Parrella T, Abate ML, Chiaberge E, Calvo PL, Manzini P, et al. 'e' antigen defective hepatitis B virus and course of chronic infection. J Hepatol 1991;13 Suppl 4:S82-6.
31. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 2005;41:771-8.
32. Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. J Immunol 2006;177:739-47.
33. Miroux C, Vausselin T, Delhem N. Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response. Expert Opin Biol Ther 2010;10:1563-72.
34. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. J Clin Invest 2004;114:701-12.
35. Gehring AJ, Sun D, Kennedy PT, Nolte-'t Hoen E, Lim SG, Wasser S, Selden C, Maini MK, Davis DM, Nassal M, Bertoletti A. The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. J Virol 2007;81:2940-9.
36. Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. Int J Epidemiol 2005;34:1329-39.
37. Pol S, Nalpas B, Driss F, Michel ML, Tiollais P, Denis J, Brecho C. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. J Hepatol 2001;34:917-21.
38. Yalcin K, Acar M, Degertekin H. Specific hepatitis B vaccine therapy in inactive HBsAg carriers: a randomized controlled trial. Infection 2003;31:221-5.

39. Jung MC, Gruner N, Zachoval R, Schraut W, Gerlach T, Diepolder H, Schirren CA, Page M, Bailey J, Birtles E, Whitehead E, Trojan J, Zeuzem S, Pape GR. Immunological monitoring during therapeutic vaccination as a prerequisite for the design of new effective therapies: induction of a vaccine-specific CD4+ T-cell proliferative response in chronic hepatitis B carriers. Vaccine 2002;20:3598-612.
40. Horiike N, Fazle Akbar SM, Michitaka K, Joukou K, Yamamoto K, Kojima N, Hiasa Y, Abe M, Onji M. In vivo immunization by vaccine therapy following virus suppression by lamivudine: a novel approach for treating patients with chronic hepatitis B. J Clin Virol 2005;32:156-61.
41. Buster EH, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW, Janssen HL. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. Gastroenterology 2009;137:2002-9.
42. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. Lancet 2005;365:123-9.
43. Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P, Pluck N. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. N Engl J Med 2004;351:1206-17.
44. Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, Longerich T, Schirmacher P, Metzler F, Zankel M, Fischer C, Currie G, Brosgart C, Petersen J. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. Hepatology 2006;44:675-84.
45. Senturk H, Baysal B, Tahan V, Zerdali H, Ozaras R, Tabak F, Mert A, Canbakan B, Tabak O, Ozbay G. Long-term effect of interferon therapy in patients with HBeAg positive chronic hepatitis B infection. Dig Dis Sci 2010;56:208-12.
46. Fattovich G, Betterle C, Brollo L, Pedini B, Giustina G, Realdi G, Alberti A, Ruol A. Autoantibodies during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis B. J Med Virol 1991;34:132-5.
47. Takkenberg RB, Weegink CJ, Zaaijer HL, Reesink HW. New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. Vox Sang 2010;98:481-94.
48. Yao GB, Zhu M, Cui ZY, Wang BE, Yao JL, Zeng MD. A 7-year study of lamivudine therapy for hepatitis B virus e antigen-positive chronic hepatitis B patients in China. J Dig Dis 2009;10:131-7.

49. Dienstag JL, Cianciara J, Karayalcin S, Kowdley KV, Willems B, Plisek S, Woessner M, Gardner S, Schiff E. Durability of serologic response after lamivudine treatment of chronic hepatitis B. Hepatology 2003;37:748-55.
50. Lok AS, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, Jovine E, Benardi M, Andreone P. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. Hepatology 2000;32:1145-53.
51. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. Gastroenterology 2009;137:1593-608 e1-2.
52. Lee YS, Suh DJ, Lim YS, Jung SW, Kim KM, Lee HC, Chung YH, Yoo W, Kim SO. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. Hepatology 2006;43:1385-91.
53. Loirat D, Lemonnier FA, Michel ML. Multiepitopic HLA-A*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. J Immunol 2000;165:4748-55.
54. Depla E, Van der Aa A, Livingston BD, Crimi C, Allosery K, De Brabandere V, Krakover J, Murthy S, Huang M, Power S, Babe L, Dahlberg C, McKinney D, Sette A, Southwood S, Philip R, Newman MJ, Meheus L. Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. J Virol 2008;82:435-50.
55. Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. Hum Immunol 1999;60:1013-7.
56. Gehring AJ, Xue SA, Ho ZZ, Teoh D, Ruedl C, Chia A, Koh S, Lim SG, Maini MK, Stauss H, Bertoletti A. Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. J Hepatol 2010;55:103-10.
57. Chen W, Shi M, Shi F, Mao Y, Tang Z, Zhang B, Zhang H, Chen L, Xin S, Wang FS. HBcAg-pulsed dendritic cell vaccine induces Th1 polarization and production of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. Hepatol Res 2009;39:355-65.
58. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000;18:767-811.
59. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol 2004;5:1219-26.
60. Sozzani S, Vermi W, Del Prete A, Facchetti F. Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. Trends Immunol 2010;31:270-7.

61. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. Annu Rev Immunol 2008;26:293-316.
62. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. J Exp Med 2001;194:1823-34.
63. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. Hum Immunol 2002;63:1133-48.
64. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. Annu Rev Immunol 2005;23:275-306.
65. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol 2004;5:987-95.
66. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med 2003;198:513-20.
67. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nat Rev Immunol 2008;8:594-606.
68. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. Semin Immunol 2005;17:253-61.
69. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. Curr Opin Immunol 2002;14:432-6.
70. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. J Exp Med 2000;192:219-26.
71. Liu C, Lou Y, Lizee G, Qin H, Liu S, Rabinovich B, Kim GJ, Wang YH, Ye Y, Sikora AG, Overwijk WW, Liu YJ, Wang G, Hwu P. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. J Clin Invest 2008;118:1165-75.
72. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. J Clin Immunol 2003;23:147-61.
73. Ito T, Amakawa R, Inaba M, Hori T, Ota M, Nakamura K, Takebayashi M, Miyaji M, Yoshimura T, Inaba K, Fukuhara S. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. J Immunol 2004;172:4253-9.

74. Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, Liu YJ, Lifson JD, Littman DR, Bhardwaj N. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. J Virol 2004;78:5223-32.
75. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. Immunity 2003;19:225-34.
76. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. Immunity 2008;29:352-61.
77. Lui G, Manches O, Angel J, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. PLoS One 2009;4:e7111.
78. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, Heshmati F, Guillet JG, Gannage M, Caillat-Zucman S, Casartelli N, Schwartz O, De la Salle H, Hanau D, Hosmalin A, Maranon C. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. Immunity 2007;27:481-92.
79. Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, Nishiwaki T, Matsuo N, Nakano A, Narumi S, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. J Exp Med 2005;202:425-35.
80. Schlecht G, Garcia S, Escriou N, Freitas AA, Leclerc C, Dadaglio G. Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation. Blood 2004;104:1808-15.
81. Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP, Plumas J. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. J Immunol 2006;176:248-55.
82. Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, Bhardwaj N. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. J Clin Invest 2008;118:3431-9.
83. Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. Blood 2009;114:1794-802.
84. Aspord C, Charles J, Leccia MT, Laurin D, Richard MJ, Chaperot L, Plumas J. A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. PLoS One 2010;5:e10458.
85. Aspord C, Laurin D, Richard MJ, Vie H, Chaperot L, Plumas J. Induction of Antiviral Cytotoxic T Cells by Plasmacytoid Dendritic Cells for

Adoptive Immunotherapy of Posttransplant Diseases. Am J Transplant 2011.
86. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, Cavallo MC, Silini EM, Andreone P, Missale G, Ferrari C. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. Gastroenterology 2010;138:682-93, 693 e1-4.
87. Luo J, Li J, Chen RL, Nie L, Huang J, Liu ZW, Luo L, Yan XJ. Autologus dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: a pilot, open label, clinical trial in human volunteers. Vaccine 2010;28:2497-504.
88. Ilan E, Arazi J, Nussbaum O, Zauberman A, Eren R, Lubin I, Neville L, Ben-Moshe O, Kischitzky A, Litchi A, Margalit I, Gopher J, Mounir S, Cai W, Daudi N, Eid A, Jurim O, Czerniak A, Galun E, Dagan S. The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. J Infect Dis 2002;185:153-61.

Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.

Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Résumé :

La réponse immune lors d'une infection par le VHB est essentielle pour éliminer le virus. Ainsi la restauration d'une immunité fonctionnelle anti-VHB pourrait représenter une approche d'immunothérapie très intéressante. Les cellules dendritiques plasmocytoides (pDC) jouent un rôle crucial dans l'immunité antivirale de part leur capacité à capturer et apprêter les antigènes viraux afin d'induire une réponse immune adaptative. C'est pourquoi nous avons pour la première fois évalué le potentiel des pDCs à restaurer l'immunité anti-VHB en contexte d'hépatite B chronique. Nous avons utilisé une lignée de pDCs HLA-A*0201^{+} chargée avec des peptides HLA-A*0201 restreints dérivés des antigènes HBc et HBs du virus afin d'amplifier des lymphocytes T spécifiques ex vivo à partir de patients atteints d'hépatite B chronique. Nous avons ensuite établi un modèle de souris humanisées (Hepato-HuPBL) afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de la stratégie in vivo. La stimulation de PBMC ou de lymphocytes infiltrant le foie (LIL) issus de patients HLA-A*0201^{+} par la lignée de pDC chargée avec le peptide HBc a pu amplifier une réponse Lymphocyte T spécifique dans 45,8% des cas. Les lymphocytes T CD8 issus du groupe de répondeurs étaient capables d'exprimer CD107 après restimulation et de lyser des hépatocytes infectés in vitro. Le groupe de non répondeurs était caractérisé par la présence d'Ag HBe et un plus fort niveau de lymphocytes T régulateurs. L'efficacité thérapeutique du vaccin de pDC a été évaluée dans un modèle de souris immunodéficientes reconstituées avec des PBMC d'un patient ayant résolu l'infection au VHB et xenotransplantées avec des hépatocytes humains infectés ou non par le VHB. La vaccination de ces souris Hepato-HuPBL avec la lignée de pDC chargée avec les peptides HBc et HBs a permis l'amplification de lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB capables de lyser spécifiquement les hépatocytes infectés in vivo. En conclusion, la lignée de pDC chargée avec des peptides dérivés du VHB est capable d'amplifier des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB et fonctionnels in vitro et in vivo. Cette nouvelle stratégie d'immunothérapie pourrait donc restaurer une immunité antivirale et permettre l'élimination du virus chez les patients atteints d'hépatite B chronique.

Abstract:

The immune control of HBV infection is essential for viral clearance. Restoring functional anti-HBV immunity is therefore a promising immunotherapeutic approach. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) play a crucial role in anti-viral immunity due to their ability to capture and process viral antigens and subsequently induce adaptive immune responses. We therefore investigated for the first time the potential of pDCs in triggering anti-viral immunity against HBV. We used a HLA-A*0201^{+} pDC line loaded with HLA-A*0201-restricted peptides derived from HBc/HBs antigens to amplify specific T cells ex-vivo from chronic HBV patients and established an Hepato-HuPBL humanized mouse model to address the therapeutic potential of the strategy in vivo. Stimulation of PBMC or liver-infiltrated lymphocytes from HLA-A*0201^{+} chronic HBV patients by the HBc peptide-loaded pDC line elicited HBV-specific CD8 T cells in 45.8% of cases. The specific T cells of the "responder" group were able to express CD107 upon restimulation and lyse infected hepatocytes in-vitro. The "non-responder" group of patients was characterised by the presence of HBeAg or higher level of regulatory T cells. The therapeutic efficacy of the pDC-vaccine was evaluated in immunodeficient NOD-SCIDβ2m$^{-/-}$ mice reconstituted with HBV patients' PBMC and xenotransplanted with human HBV-infected hepatocytes. Vaccination of Hepato-HuPBL mice with the HBc/HBs peptide-loaded pDC line elicited HBV-specific T cells in-vivo able to specifically lyse infected hepatocytes. pDCs loaded with HBV-derived peptides can elicit functional virus-specific T cells in-vitro and in-vivo. This new cell-based immunotherapeutic strategy could restore functional anti-viral immunity and clear the virus in chronic HBV patients.