

Rôle de l'indoléamine-2,3-dioxygénase dans la persistance des infections virales

Quentin Lepiller

▶ **To cite this version:**

Quentin Lepiller. Rôle de l'indoléamine-2,3-dioxygénase dans la persistance des infections virales. Virologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ008 . tel-01303746

HAL Id: tel-01303746
https://theses.hal.science/tel-01303746

Submitted on 18 Apr 2016

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR_S 1109 - Immuno-Rhumatologie Moléculaire (IRM)

THÈSE présentée par :

Quentin Lepiller

soutenue le : **18 mars 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Rôle de l'indoléamine-2,3-dioxygénase dans la persistance des infections virales

THÈSE dirigée par :

Dr. BARTH Heidi	MCU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. ALAIN Sophie	PU-PH, Université de Limoges
Pr. DUVERLIE Gilles	PU-PH, Université d'Amiens

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. ROHR Olivier	PU, Université de Strasbourg

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Merci au Pr. Sophie Alain et au Pr. Gilles Duverlie d'avoir accepté d'être rapporteurs externes de mon travail de thèse. Merci au Pr. Olivier Rohr d'avoir accepté une nouvelle fois d'être examinateur de mon travail, après m'avoir déjà fait l'honneur de juger ma thèse de médecine et mon travail à mi-parcours.

Un grand merci au Dr. Heidi Barth d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse. C'est un privilège d'avoir pu travailler avec toi durant ces 3 ans. Merci de m'avoir fait profiter de ton expérience et de tes connaissances en virologie, de m'avoir permis de surmonter les difficultés techniques et humaines que j'ai pu rencontrer durant ce travail et de m'avoir prodigué de multiples conseils dans les manips et dans la rédaction du manuscrit. Tes qualités humaines et scientifiques sont pour moi un exemple.

Merci au Pr. Siamak Bahram, Directeur de l'UMR_1109, d'avoir accepté de m'accueillir dans son unité pour cette dernière année de thèse et d'avoir soutenu mon travail.

Merci au Pr. Thomas Baumert, Directeur de l'UMR_1110, de m'avoir accueilli dans son unité et de m'avoir permis de réaliser dans de bonnes conditions le début de ce travail de thèse.

Merci au Pr. Françoise Stoll-Keller de m'avoir accueilli comme AHU dans le laboratoire de Virologie, de m'avoir toujours soutenu avec une grande humanité et de m'avoir accordé sa confiance dans les activités de routine, d'enseignement et de recherche.

Merci à Eric Soulier pour son soutien technique important, pour ses nombreux conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur. C'est une chance pour moi d'avoir pu bénéficier de ta grande expérience et de ta maitrise des techniques de biologie moléculaire.

Merci à Jochen Barths pour son aide précieuse en cytométrie de flux, sa disponibilité (parfois très tard le soir) et son humour. Merci également à Mélanie Lambotin pour son aide technique et ses précieux conseils.

Merci à l'ensemble des membres des UMR_1109 et 1110 avec qui j'ai eu la chance de travailler, en particulier Emilie, Lamine, Marie et Mathieu ainsi que les membres de l'équipe HIV : Bin, Camille, Christiane, Géraldine, Thomas et Sylvie.

Merci à Charlotte pour les multiples services rendus et pour sa bonne humeur au quotidien.

Merci à Morgane, Mariam et Angéline pour leur aide et leur gentillesse.

Merci à Véronique pour les nombreux services rendus et les bons gâteaux et merci à l'ensemble des biologistes : Aurélie, Hicham, Jean-Pierre, Marie-Jo, Marie-Paule, Pierre Z et Samira.

Merci à Lola pour sa gentillesse et son soutien précieux. Merci à l'ensemble des équipes de culture et de BM : Anne E, Anne F, Anne-Laure, Audrey, Fiorella, Fred, Julien, Marie-Marie, Murielle, Rachel, Sandrine, Simone, Stéphanie. Merci également à mes voisins bactériologistes : Antoine, Christelle, Laurence, Quentin, Valérie.

Merci à mes parents pour leur soutien continu ainsi qu'à Marlyse, Philippe et Adelio. Merci à Mihaela, Mihary, Kristina et Paul pour leur présence et les très bons moments passés ensembles à Besançon et à Strasbourg. Merci à Mathilde, Didier, Marianne et Audran pour leur soutien et leur amitié.

A la mémoire du

Dr. Clément Chéhensse

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**

LISTE DES ABREVIATIONS **6**

LISTE DES FIGURES **9**

LISTE DES TABLEAUX **11**

REVUE DE LA LITTERATURE **12**

Partie I : L'hépatite C **13**

I. Le virus de l'hépatite C 13

1. Découverte du virus de l'hépatite C 13

2. Classification et variabilité génétique 13

2.1. Classification taxonomique du VHC 13

2.2. Variabilité génétique et évolution du VHC 14

3. La particule virale du VHC 17

3.1. Structure générale 17

3.2. Organisation génomique et protéines virales 17

3.2.1. Les régions non-traduites 17

3.2.2. Les régions codantes et les protéines virales 18

4. Le cycle de réplication virale 20

4.1. Entrée du virus 20

4.2. Réplication du génome et synthèse des protéines virales 22

4.3. Assemblage et libération des particules virales 23

5. Modèles d'étude 23

5.1.* Modèles *in vivo 23

5.1.1. Le chimpanzé 23

5.1.2. Modèles murins 24

5.2. Modèles *in vitro* 25
5.2.1. Développement des modèles *in vitro* 25
5.2.2. Les pseudo-particules du VHC 25
5.2.3. Les réplicons 26
5.2.4. Les particules du VHC produites en culture cellulaire 27
II. L'hépatite C : considérations cliniques 28
1. Epidémiologie 28
2. Modes de transmission du VHC 30
2.1. Contamination parentérale et percutanée 30
2.2. Autres modes de contamination 31
3. Histoire naturelle de l'infection 32
3.1. Hépatite aiguë 32
3.2. Hépatite chronique et complications 33
4. Diagnostic biologique de l'hépatite C 34
4.1. Diagnostic direct 34
4.2. Diagnostic indirect 36
5. Traitements de l'hépatite C et approches vaccinales 36
5.1. Traitements de l'hépatite C 36
5.2. Approches vaccinales 38
III. Réponse immunitaire contre le VHC 39
1. Réponse immunitaire innée 39
2. Réponse immunitaire adaptative 43
2.1. Immunité cellulaire contre le VHC 43
2.2. Immunité humorale contre le VHC 44
3. Echappement du VHC au système immunitaire 45
3.1. Echappement à l'immunité innée 45
3.2. Echappement à l'immunité adaptative : 47
Partie II : indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO) 51
I. Le catabolisme du tryptophane 51

1. Le tryptophane 51
2. La voie des kynurénines 52
3. Trois dioxygénases pour une même réaction 54
3.1. TDO 54
3.2. IDO-1 et IDO-2 54
II. L'indoléamine-2,3-dioxygénase 56
1. Le gène *IDO-1* et son expression 56
2. La protéine IDO-1 et son activité enzymatique 57
3. Expression de IDO 59
3.1. Contextes d'expression de IDO 59
3.2. Stimulation de IDO par l'IFN-γ 59
3.3. Stimuli pro-inflammatoires et motifs microbiens 60
3.4. Stimuli immunosuppresseurs et tolérogènes 62
3.5. Activateurs non-immuns 64
4. Inhibiteurs pharmacologiques de IDO 64
III. Influence de IDO sur la réponse immunitaire 65
1. Rôle de IDO dans la tolérance immunitaire 65
2. Expression de IDO par les cellules présentatrices d'antigènes 66
3. Impact de IDO sur les lymphocytes T 67
3.1. La déplétion en tryptophane 67
3.2. L'accumulation de kynurénines 68
3.3. Profil général de la réponse lymphocytaire T en présence de IDO 70
IV. Implication de IDO en pathologie 71
1. Pathologies non-infectieuses 71
1.1. Tolérance materno-foetale 71
1.2. Transplantation d'organes 72
1.3. Cancers 72
1.4. Troubles neurologiques et psychiatriques 73
2. Pathologies infectieuses 74
2.1. Le double visage de IDO au cours des infections 74

2.2. Infections bactériennes et parasitaires 74
2.3. Infections virales 76

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 81

MATERIELS ET METHODES 83

I. Culture cellulaire 83
1. Cellules primaires et lignées cellulaires 83
2. Stimulation des cellules par les interférons et quantification de l'IFN-γ 84
II. Virus 84
1. Virus produits en culture cellulaire (VHCcc) 84
2. Isolat clinique du VHC 86
3. Pseudo-particules du VHC (VHCpp) 86
4. Réplicon subgénomique du VHC 87
III. Analyses en RT-PCR quantitative 87
IV. Western Blotting 88
1. Anticorps utilisés 88
2. Etapes du Western Blotting 88
V. Analyse de l'activité enzymatique de IDO 89
1. Mesure de l'activité enzymatique de IDO 89
2. Blocage de l'activité enzymatique de IDO et mesure de la viabilité cellulaire 89
VI. Transfection de plasmides et interférence ARN 90
VII. Cytométrie de flux 91
1. Expression des antigènes de surface et des antigènes intracellulaires par cytométrie de flux 91
2. Activation de la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ 92
3. Expériences de co-culture cellulaire 92
VIII. Analyses statistiques 93

RESULTATS 94

I. Les hépatocytes primaires humains expriment IDO-1 94

II. IDO-1 est fonctionnellement active dans les hépatocytes primaires humains 96
III. Le VHC stimule l'expression de IDO-1 dans les hépatocytes 97
IV. Le VHC stimule l'expression des interférons et de gènes stimulés par les interférons dans les hépatocytes 99
V. Le VHC stimule l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1 101
VI. L'IFN-γ produit par les lymphocytes T $CD4^+$ contribue à l'activation hépatique de IDO-1 103
VII. La protéine IRF-1 régule l'expression de IDO-1 induite par le VHC 104
VIII. Expression hépatocytaire de IDO-1 et blocage pharmacologique de son activité enzymatique: validation du modèle 107
IX. IDO-1 exerce une action antivirale sur le VHC 109
X. IDO-1 contribue à l'effet antiviral des interférons 112
XI. IDO produite par les hépatocytes inhibe la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ 113

DISCUSSION 117

I. Expression de IDO dans les hépatocytes infectés par le VHC 117
II. Rôle antiviral de IDO sur le VHC 118
III. Modalités d'activation de IDO lors de l'infection par le VHC 120
IV. Rôle de IDO dans l'immunosuppression 123
V. Impact de IDO *in vivo* 126
VI. Place des inhibiteurs de IDO 127
VII. Place de TDO et de IDO-2 129
VIII. Vers un impact plus large de IDO au cours de l'hépatite C 130

CONCLUSION 133

REFERENCES 135

ANNEXE I 135

ANNEXE II 135

LISTE DES ABREVIATIONS

AhR	*Aryl hydrocarbon receptor*
ALAT	Alanine aminotransférase
AP1	*Activator protein 1*
CFSE	*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CLDN1	Claudine-1
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CTLA-4	*Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*
DAAs	*Direct-Acting Antivirals*
DC	*Dendritic cell*
EBV	Epstein-Barr virus
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*
eIF2A	*Eukaryotic translation initiation factor 2A*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EMCV	Virus de l'encéphalomyocardite
EphA2	*Ephrin receptor A2*
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GAS	*Gamma-interferon activation sequence*
GCN2	*General control nonderepressible 2*
GFP	*Green fluorescent protein*
GITR	*Glucocorticoïd-induced TNF-related protein*
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
3-HAA	Acide 3-hydroxyanthranilique
HEK-293T	*Human embryonic kidney cells 293T*
3-HK	3-hydroxykynurénine
HPH	Hépatocytes primaires humains
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HTA	*Host-targeting agent*
HVR	*Hypervariable region*
ICTV	Comité international de taxonomie des virus
IDO	Indoléamine-2,3-dioxygénase

IFN	Interféron
IL	Interleukine
IP	Index de prolifération
IP-10	*Interferon gamma-induced protein 10*
IRES	*Internal ribosome entry site*
IRF	*Interferon regulatory factor*
ISG	*Interferon stimulated gene*
ISRE	*Interferon-stimulated response element*
IV	Intraveineuse
JAK	Janus kinase
JFH1	*Japanese fulminant hepatitis 1*
Kyn	Kynurénine
LDL	*Low density lipoprotein*
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	*Long terminal repeat*
Luc	Luciférase
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MAVS	*Mitochondrial antiviral signaling protein*
MDA5	*Melanoma differentiation-associated protein 5*
miR	*Micro-ARN*
MLV	*Murine leukemia virus,* virus de la leucémie murine
MOI	*Multiplicity of infection*
1-MT	1-méthyl-tryptophane
mTOR	*Mammalian target of rapamycin*
MTT	*3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NC	Non codant
NF-κB	*Nuclear factor κB*
NK	*Natural killer*
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NPC1L1	*Niemann-Pick C1-like 1*
OAS	2'-5' oligoadénylate synthase
OCLN	Occludine
ORF	*Open reading frame*
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*

PBMC	*Peripheral blood mononuclear cells*
PBS	*Phosphate buffer saline*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PD-1	*Programmed cell death protein 1*
PD-L1	*Programmed death-ligand 1*
pDC	*Plasmacytoid dendritic cell*
PKR	Protéine kinase R
RIG-I	*Retinoic acid-inducible gene I*
RLR	*RIG-I-like receptor*
RVS	Réponse virologique soutenue
SCID	*Severe combined immunodeficiency*
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis*
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNC	Système nerveux central
SOCS	*Suppressor of cytokine signaling*
SR-BI	*Scavenger receptor class B type 1*
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
SVF	Sérum de veau fœtal
TDO	Tryptophane-2,3-dioxygénase
TGF-β	*Transforming growth factor* β
TIM-3	*T-cell immunoglobulin and mucin domain 3*
TLR	*Toll-like receptor*
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRIF	*Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-*β
Try	Tryptophane
TNF-α	*Tumor necrosis factor α*
UI	Unité internationale
uPA	*Urokinase-type plasminogen activator transgene*
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHCcc	Virus de l'hépatite C produit en culture cellulaire
VHCpp	Pseudo-particule virale du virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	*Very low density lipoprotein*
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculeuse

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution des génotypes et sous-types du VHC 16

Figure 2 : Structure générale du virus 17

Figure 3 : Organisation fonctionnelle du génome viral 20

Figure 4 : Entrée du VHC dans l'hépatocyte 21

Figure 5 : Cycle de réplication du VHC 22

Figure 6 : Modèle des pseudo-particules du VHC (VHCpp) 26

Figure 7 : Modèle de réplicon subgénomique du VHC 27

Figure 8 : Répartition mondiale des infections actives à VHC 29

Figure 9 : Distribution des génotypes du VHC dans le monde 30

Figure 10 : Profils d'évolution de l'hépatite C aiguë 32

Figure 11 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC 34

Figure 12 : Déclenchement de la réponse immunitaire innée. 42

Figure 13 : Réponse immunitaire au cours de l'hépatite C 49

Figure 14 : Représentation chimique du tryptophane 51

Figure 15 : La voie des kynurénines. 54

Figure 16 : Régions régulatrices sur le promoteur du gène IDO-1 57

Figure 17 : Structure de la protéine IDO-1 58

Figure 18 : Voies d'activation de IDO 61

Figure 19 : Expression de IDO dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes après contact avec les lymphocytes Tregs 63

Figure 20 : Régulation des lymphocytes T par IDO 70

Figure 21 : Production des VHCcc. 85

Figure 22 : Représentation schématique du réplicon Rep-PI-Luc. 87

Figure 23 : Représentations chimiques du 1-méthyl-tryptophane et de la nécrostatine..... 90

Figure 24 : Etapes de la co-culture des lymphocytes T CD4$^+$ et des cellules Huh7.5.1 93

Figure 25 : Expression de IDO-1 dans les HPH 95

Figure 26 : Activité enzymatique de IDO dans les HPH. 97

Figure 27 : Le VHC stimule l'expression de IDO-1 dans les hépatocytes 98

Figure 28 : Expression des IFNs et des gènes stimulés par les IFNs dans les hépatocytes infectés. 100

Figure 29 : Le VHC active l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1 102

Figure 30 : Les lymphocytes T CD4$^+$ activés contribuent à l'induction hépatique de IDO .. 103

Figure 31 : IRF-1 régule l'expression hépatique de IDO-1 induite par le VHC..... 105

Figure 32 : Activation de STAT-1 dans les cellules Huh7.5.1 infectées par le JFH1 et stimulées par l'IFN-γ.....106

Figure 33 : Surexpression de IDO-1 dans les hépatocytes et blocage de son activité enzymatique 108

Figure 34 : Impact de l'expression hépatique de IDO-1 sur la réplication du VHC 111

Figure 35 : IDO-1 contribue à l'effet anti-VHC de l'IFN-α. 113

Figure 36 : L'expression hépatique de IDO-1 inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4$^+$ activés 116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Elévation du ratio des concentrations sériques Kyn/Try lors d'infections virales chez l'homme 77

Tableau 2 : Effet antiviral de IDO 78

REVUE DE LA LITTERATURE

Partie I : L'hépatite C

I. Le virus de l'hépatite C

1. Découverte du virus de l'hépatite C

Au milieu du XX^{ème} siècle, près du tiers des patients bénéficiant d'une transfusion sanguine développait une hépatite. La majorité de ces hépatites n'était liée ni au virus de l'hépatite A, ni au virus de l'hépatite B mais à un agent étiologique inconnu dénommé « non-A-non-B » (NANB) (Alter and Houghton, 2000). L'agent NANB induisait des hépatites chroniques et parfois des cirrhoses (Feinstone et al., 1975). Lorsque du sérum de patient présentant une hépatite NANB était injecté au chimpanzé, celui-ci développait lui aussi des signes clinico-biologiques d'hépatite (Tabor et al., 1978). Au milieu des années 1980s, des études physicochimiques basées sur des techniques de filtration et d'inactivation par le chloroforme révélèrent que l'agent des hépatites NANB était probablement un virus enveloppé, à ARN, d'une taille inférieure à 80 nm (Bradley et al., 1983; Feinstone et al., 1983; He et al., 1987). Cependant, les méthodes virologiques standards ne parvenaient pas à isoler et à identifier le virus.

La découverte du virus de l'hépatite C a bénéficié de l'essor des techniques de biologie moléculaire de la fin des années 1980s. A partir du sérum d'un chimpanzé infecté, l'équipe de Michael Houghton prépara une banque d'ADN complémentaires (ADNc) clonés dans des vecteurs d'expression. L'un de ces clones, le « 5-1-1 », produisait une protéine reconnue par les anticorps sériques d'un patient infecté par l'agent NANB (Choo et al., 1989). Grâce à des techniques d'hybridation moléculaire, l'ADNc de ce tout premier clone servit de sonde pour caractériser un génome viral à ARN d'organisation comparable aux génomes des virus de la famille des *Flaviviridae*. L'agent responsable des hépatites NANB était enfin identifié et fut nommé « virus de l'hépatite C ».

2. Classification et variabilité génétique

2.1. Classification taxonomique du VHC

La famille des ***Flaviviridae*** comporte actuellement 4 genres répertoriés par le comité international de taxonomie des virus (ICTV) (http://www.ictvonline.org) :

(1) Le virus de l'hépatite C (VHC) est l'unique espèce du genre ***Hepacivirus*** répertoriée par l'ICTV. Cependant, la découverte récente d'espèces apparentées au VHC chez le chien, le cheval et chez plusieurs rongeurs permet d'entrevoir une distribution bien plus large des *Hepacivirus* dans le règne animal (Burbelo et al., 2012; Drexler et al., 2013; Kapoor et al., 2011). Cette découverte éclaire d'un jour nouveau les hypothèses sur l'origine et sur l'émergence du VHC (Simmonds, 2013).

(2) Le genre ***Flavivirus*** regroupe plus de 50 espèces dont de nombreux arbovirus. On y distingue en particulier (i) des virus transmis par les moustiques *Culex* tels que le virus de l'encéphalite japonaise et le virus West Nile, (ii) des virus transmis par des tiques tels que le virus de l'encéphalite à tiques, (iii) des virus transmis par des moustiques *Aedes* tels que le virus de la fièvre jaune et le virus de la dengue (Gould and Solomon, 2008).

(3) Le genre ***Pestivirus*** comprend des virus pathogènes pour les ruminants et les porcs, responsables de pathologies fœtales, digestives ou de syndromes hémorragiques (Schweizer and Peterhans, 2014).

(4) Le genre ***Pegivirus*** a été récemment reconnu par l'ICTV et comprend les 2 espèces Pegivirus A et B capables d'infecter certains primates. La pathogénicité de ces virus pour l'homme n'a pas été clairement établie à ce jour. Des espèces apparentées découvertes chez des primates non-humains et chez des chauve-souris sont en attente de classification (Stapleton et al., 2011).

2.2. Variabilité génétique et évolution du VHC

La variabilité génétique du VHC est particulièrement élevée. Elle repose sur l'absence d'activité de relecture-correction (*proof-reading*) de l'ARN polymérase ARN-dépendante virale (la protéine NS5B), à l'origine d'un taux élevé de mutations compris entre 10^{-5} et 10^{-3} substitutions/site/année (Lutchman et al., 2007; Powdrill et al., 2011; Ribeiro et al., 2012). Chez les patients infectés, l'évolution continue du VHC est liée à sa variabilité génétique et à l'abondance de la production virale qui peut atteindre 10^{12} virions/jour (Neumann et al., 1998). Elle aboutit à une hétérogénéité et une adaptabilité des populations virales qui jouent un rôle central dans la persistance du virus dans l'organisme, son échappement au système immunitaire et sa sensibilité aux traitements (Chayama and Hayes, 2011; Domingo and Gomez, 2007; Farci et al., 2000).

Il est intéressant de noter que cette variabilité génétique n'est pas distribuée uniformément le long du génome. Certaines régions sont relativement conservées comme les régions 5' et 3' non codantes (NC) qui comportent des séquences indispensables à la réplication et à la traduction de l'ARN viral. A l'inverse, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et la protéine non structurale NS5A sont beaucoup plus variables. Les glycoprotéines d'enveloppe comportent en particulier des régions hypervariables (*Hypervariable regions*, HRV) impliquées dans l'échappement immunitaire et l'adaptation du virus aux pressions de sélection (Simmonds, 2004).

Les différents isolats du VHC sont actuellement répartis en 7 génotypes (numérotés de 1 à 7) dont les séquences nucléotidiques diffèrent de 30 à 35 %. Les génotypes sont eux-mêmes subdivisés en plus de 80 sous-types (désignés par une lettre minuscule : 1a, 1b, etc…) (Simmonds et al., 2005; Smith et al., 2014; http://talk.ictvonline.org , mise à jour novembre 2014). Au sein de chaque sous-type, on distingue plusieurs isolats viraux (Figure 1). La diversité virale est également présente à l'échelle de l'individu infecté, porteur d'un mélange complexe de variants viraux génétiquement distincts bien qu'apparentés appelé « quasi-espèce » virale (Domingo et al., 2012; Martell et al., 1992). Cette quasi-espèce évolue de façon dynamique chez son hôte en fonction des pressions de sélection exercées sur le virus (Domingo et al., 2012).

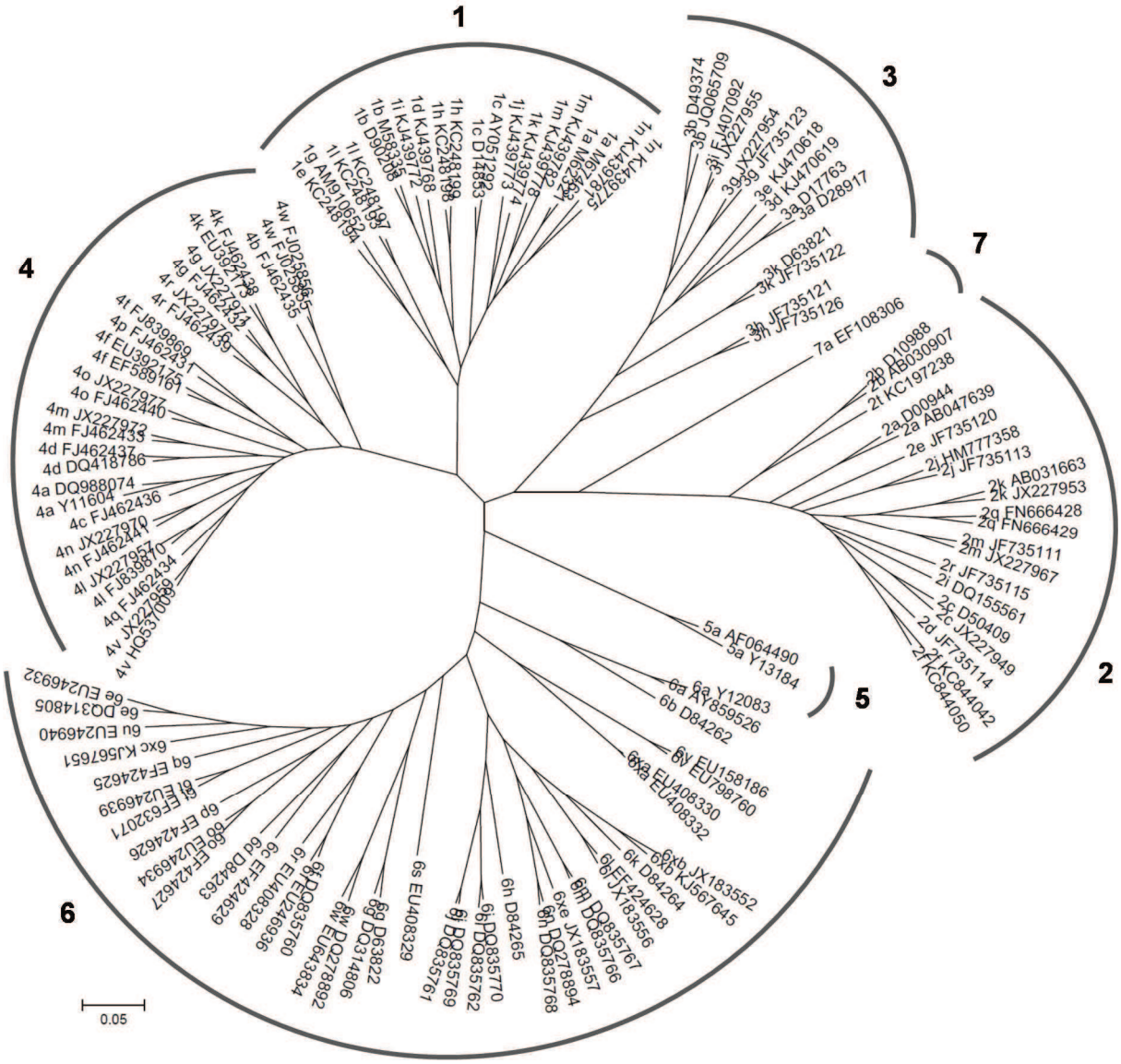


Figure 1 : Distribution des génotypes et sous-types du VHC.

Arbre phylogénétique représentant les 7 génotypes et les 81 sous-types du VHC actuellement répertoriés. Les sous-types en attente de classification ne sont pas représentés (séquences obtenues sur : (http://talk.ictvonline.org , mise à jour novembre 2014). Chaque séquence est nommée par son génotype et son sous-type suivis par son numéro d'accession Genbank. Jusqu'à 2 séquences nucléotidiques représentatives de chaque sous-type ont été alignées puis classées en phylogénie par une approche en maximum de vraisemblance basée sur le modèle de Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993) en utilisant le logiciel MEGA6 (Tamura et al., 2013). L'arbre est dessiné à l'échelle, avec une longueur de branches proportionnelle au nombre de substitutions par site. L'analyse a impliqué 129 séquences nucléotidiques. Les positions contenant des données manquantes ont été éliminées pour aboutir à un nombre final de 7141 positions analysées.

3. La particule virale du VHC

3.1. Structure générale

Le VHC possède un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 9,6 kb. Il est organisé en une seule phase ouverte de lecture entourée par des régions non codantes (NC) aux extrémités 5' et 3'. Le génome est protégé par une capside icosaédrique formée par l'assemblage de la protéine Core (ou C) du VHC. Une enveloppe lipidique entoure la capside. Elle porte des glycoprotéines E1 et E2 assemblées de façon non covalentes en hétérodimères (Figure 2).

Les virions mesurent entre 30 et 80 nm de diamètre et sont en étroite association avec les lipoprotéines de l'hôte (de types VLDL et LDL) lorsqu'ils circulent dans le sérum. L'ensemble forme une particule « lipovirale » de densité faible et hétérogène (André et al., 2002; Merz et al., 2011).

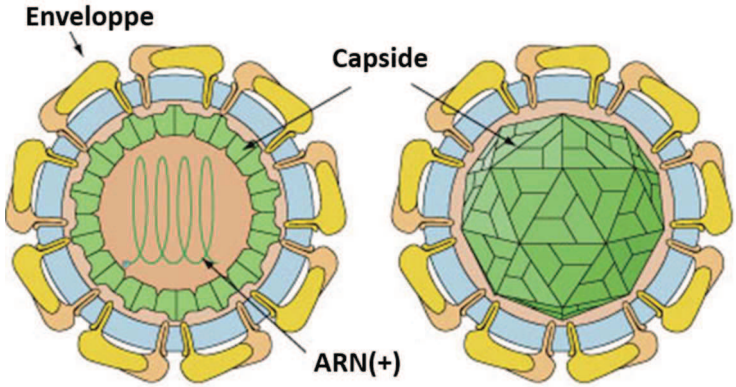


Figure 2 : Structure générale du virus.
Le VHC est une particule enveloppée formée d'une capside icosaédrique et d'un génome à ARN(+) simple brin. L'enveloppe porte les glycoprotéines E1 et E2. L'enveloppe et la capside sont représentées respectivement en bleu et en vert sur le schéma. Les glycoprotéines d'enveloppe sont représentées en jaune et beige. Les composés lipidiques liés à la particule virale circulante ne sont pas représentés.

3.2. Organisation génomique et protéines virales

3.2.1. Les régions non-traduites

Les régions non codantes 5'NC et 3'NC contiennent des éléments indispensables à la réplication et à la traduction de l'ARN viral. De nombreux facteurs cellulaires se fixent et interagissent avec ces régions du VHC (2013).

La région 5'NC contient le site d'entrée interne des ribosomes (*Internal ribosome entry site,* IRES), une région de structure secondaire en tiges-boucles qui permet à l'ARN viral de se fixer sur la sous-unité 40S du ribosome et de pallier à l'absence de coiffe en 5' (Friebe et al., 2001). En 5'NC se trouvent également des séquences reconnues par le micro-ARN (miR)-122 de l'hôte (Figure 3). La fixation de miR-122 prévient la dégradation du génome viral par les *RNases* cellulaires et stimule la traduction en protéines. L'abondance de miR-122 dans les hépatocytes permet d'expliquer au moins en partie l'hépatotropisme du VHC (Henke et al., 2008; Jopling et al., 2005; Machlin et al., 2011).

A la différence des ARNm cellulaire, l'ARN du VHC ne contient pas de queue de poly(A) en 3' mais une séquence de polyuridines entrecoupée de résidus cytosines (polyU/UC) nécessaire à la traduction de l'ARN viral en protéines. La région 3'NC est également formée d'un domaine variable court et d'un domaine plus conservé 3'X contenant des éléments régulateurs importants pour la synthèse du brin ARN(-) (Figure 3) (Tanaka et al., 1996; 2013).

3.2.2. Les régions codantes et les protéines virales

Le génome du VHC contient un seul cadre ouvert de lecture. Il est traduit en une polyprotéine d'environ 3 000 acides aminés, secondairement clivée par des peptidases cellulaires et par des protéases virales pour produire 3 protéines structurales et 7 protéines non-structurales (Figure 3). Une caractéristique importante des protéines du VHC est leur aspect plurifonctionnel au cours de la réplication virale et leurs nombreuses interactions avec les protéines de l'hôte. Au cours du cycle de réplication, les protéines du VHC agissent au sein d'un réseau de membranes lipidiques dérivées du réticulum endoplasmique appelé réseau membraneux. Ils y forment de véritables complexes de réplication virale (Miller and Krijnse-Locker, 2008; Moradpour et al., 2007).

Protéines de structure :

La protéine **Core (ou C)** est la protéine de capside. Elle est constituée de 2 domaines qui s'auto-assemblent avec l'ARN viral pour former la nucléocapside (2013). Son interaction avec les protéines de l'hôte permet de moduler plusieurs processus cellulaires comme la transcription ou l'apoptose (McLauchlan, 2000).

Les glycoprotéines **E1 et E2** forment un hétérodimère ancré dans l'enveloppe virale. Elles permettent la fixation du virus aux récepteurs cellulaires et la fusion des membranes. Situées à la surface de la particule virale, les glycoprotéines E1 et E2 sont des cibles importantes pour les anticorps de l'hôte (Fafi-Kremer et al., 2012).

Protéines non structurales :

La protéine **p7** est une viroporine dont les polymères forment un canal ionique nécessaire à l'assemblage et à la libération du virus (Wozniak et al., 2010).

La protéine **NS2** et le complexe **NS3-NS4A** agissent en auto-protéases et interviennent dans le clivage co- ou post-traductionnel de la polyprotéine virale (2013). A côté de ce rôle dans la maturation des protéines virales, la protéase NS3-NS4A clive des protéines importantes de l'hôte telles que les protéines adaptatrices MAVS et TRIF impliquées dans la réponse immunitaire innée (Voir chapitre spécifique) (Horner and Gale, 2013). En outre, la protéine NS3 possède une activité hélicase essentielle à la réplication de l'ARN viral et intervient dans l'assemblage de la particule virale en cours de formation (Serebrov and Pyle, 2004).

NS4B est une protéine hautement hydrophobe indispensable à la formation du réseau membraneux (Egger et al., 2002). Elle possède des sites de liaison à l'ARN et aux autres protéines non structurales du VHC et semble jouer un rôle important durant l'étape d'assemblage des néo-virions (Jones et al., 2009)

NS5A est une phosphoprotéine clé dans la régulation de la réplication virale et dans l'assemblage de la nucléocapside (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). Sa régulation semble dépendre en grande partie de la phosphorylation de ses nombreux résidus sérines (Huang et al., 2007). NS5A interagit avec de nombreuses protéines de l'hôte impliquées dans la régulation de la transcription, l'apoptose ou le contrôle du cycle cellulaire (Bartenschlager et al., 2004; 2013). Parmi les protéines qui interagissent avec NS5A, la cyclophiline A est soupçonnée de jouer un rôle essentiel durant la réplication virale et pourrait constituer une cible antivirale précieuse dans le traitement de l'hépatite C (Flisiak et al., 2009; Kaul et al., 2009).

NS5B est l'ARN polymérase ARN-dépendante virale (réplicase). Elle est responsable de la réplication de l'ARN(+) du VHC via la formation d'une matrice intermédiaire d'ARN(-). Elle possède une structure tridimensionnelle traditionnelle en « main-droite » avec une organisation en plusieurs sous-domaines (doigts, paume, pouce) (Simister et al., 2009).

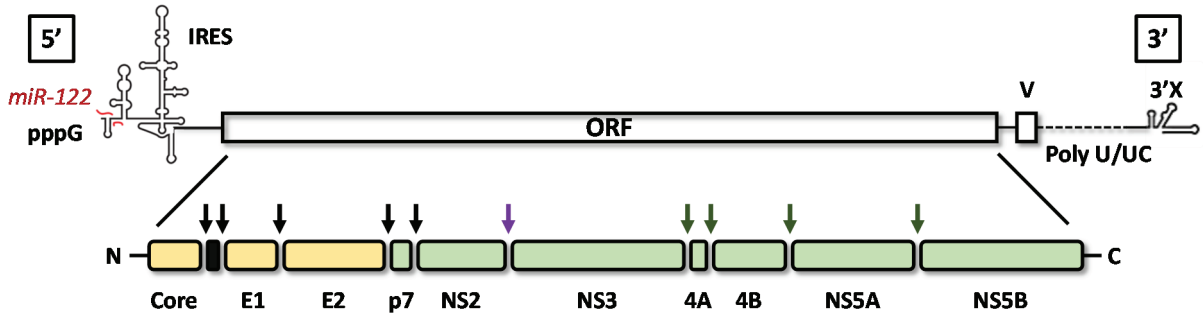


Figure 3 : Organisation fonctionnelle du génome viral.

En haut : *le génome viral est formé d'un seul cadre ouvert de lecture (*Open reading frame, ORF*) flanqué par deux régions non codantes. La région 5'NC comporte l'IRES et des séquences de fixation pour le miR-122 de l'hôte (en rouge). La région 3'NC comporte une région variable (V) suivie d'une séquence polyU/UC et de la séquence 3'X.* ***En bas :*** *Le génome du VHC code pour une polyprotéine secondairement clivée par des peptidases de l'hôte (flèches noires) et par les protéases virales NS2 (flèche violette) et NS3-NS4A (flèches vertes) pour former les protéines de structure (beige) et les protéines non structurales (vert).*

4. Le cycle de réplication virale

La cellule cible majeure du VHC chez l'homme et le chimpanzé est l'hépatocyte (2013). Les différentes étapes de réplication du VHC seront donc décrites dans cette cellule.

4.1. Entrée du virus

L'entrée du VHC est un processus en plusieurs étapes, médiées par l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe E1-E2 et différents récepteurs et co-récepteurs exprimés à la surface des hépatocytes (Figure 4). La particule virale est initialement adsorbée sur la membrane plasmique en s'attachant à des résidus glycosaminoglycanes (Barth et al., 2003; Lefèvre et al., 2014; Shi et al., 2013). Un attachement du VHC sur les récepteurs des LDL, médié par les apolipoprotéines associées au virion, a également été suggéré (Agnello et al., 1999). Après l'étape d'attachement, la particule virale utilise séquentiellement au moins 4 facteurs d'entrée pour pénétrer dans la cellule : le *scavenger receptor class B type I* (SR-BI) (Scarselli et al., 2002), la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998) associée à la claudine-1 (CLDN1) (Evans et al., 2007; Harris et al., 2010) et l'occludine (OCLN) (Figure 4) (Ploss et al., 2009). En plus de ces protéines qui interagissent directement avec la particule virale, d'autres protéines cellulaires - toutes aussi essentielles - agissent indirectement pour permettre l'entrée du virus. Ainsi, les récepteurs à activité tyrosine kinase *epidermal growth*

factor receptor (EGFR) et *ephrin receptor A2* (EphA2) et le transporteur de cholestérol *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1) sont d'importants cofacteurs d'entrée du VHC (Lupberger et al., 2011; Sainz et al., 2012). L'activation de l'EGFR et de protéines kinases de l'hôte a été impliquée dans la régulation des interactions entre CD81 et CLDN1 et dans la fusion des membranes (Lupberger et al., 2011; Zona et al., 2013).

Après son attachement, le virus pénètre dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard et al., 2006) et atteint le compartiment des endosomes précoces où la fusion des membranes et la décapsidation ont probablement lieu (Coller et al., 2009).

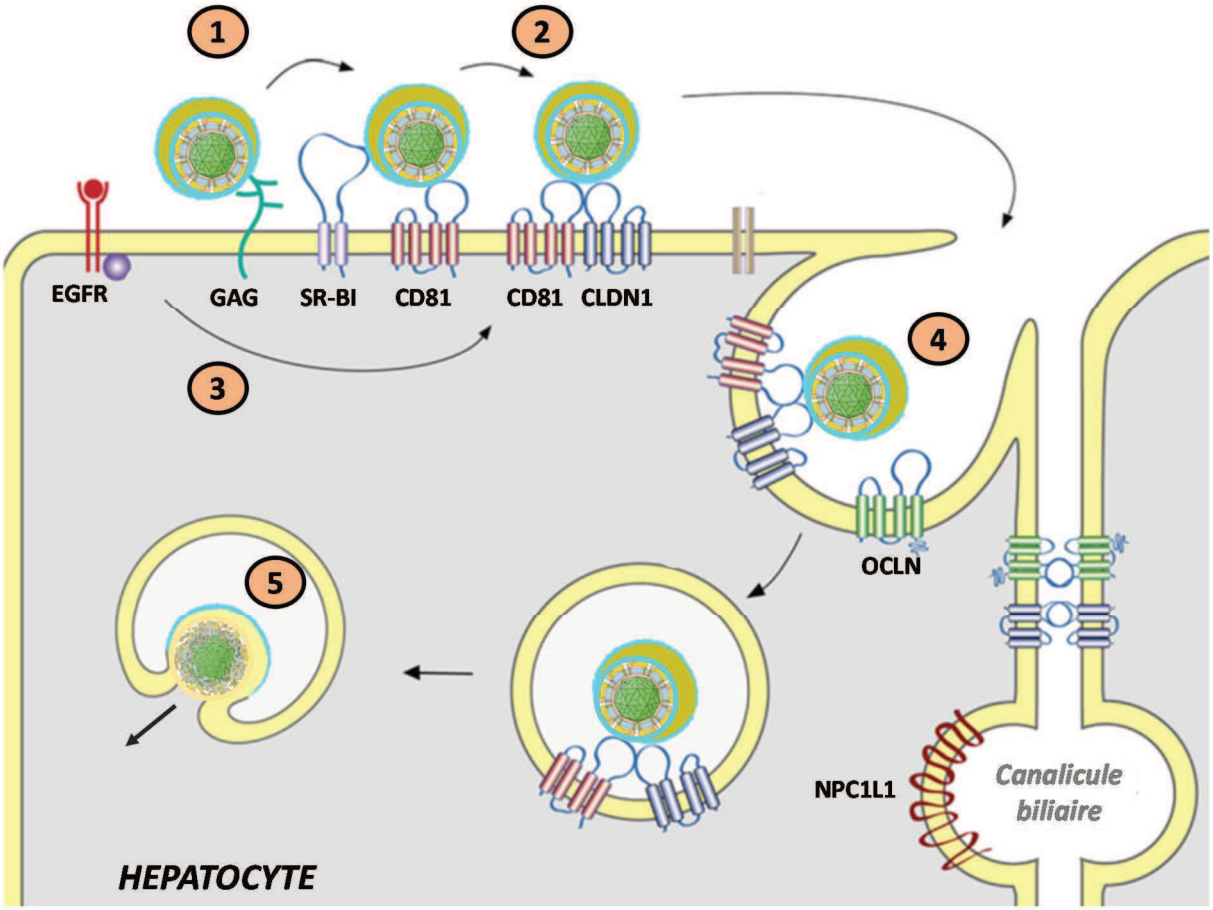


Figure 4 : Entrée du VHC dans l'hépatocyte.

Les particules circulantes du VHC sont associées à des lipoprotéines pour former une particule lipovirale. Après l'attachement à des glycosaminoglycanes (GAG) (1), le virus pénètre dans la cellule grâce à l'action séquentielle des protéines SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN (2). L'activation d'EGFR et de kinases cellulaires favorise l'interaction de CD81 et de la CLDN1 nécessaire à l'entrée du virus (3). La protéine NPC1L1 participe à l'entrée du virus. Le virus pénètre dans la cellule par endocytose (4). L'acidification de l'endosome favorise la fusion des membranes et la décapsidation virale (5). Adapté de (Dubuisson and Cosset, 2014).

4.2. Réplication du génome et synthèse des protéines virales

La traduction du génome viral ARN(+) est assurée par la machinerie traductionnelle de l'hôte. Elle est initiée par la fixation de l'IRES de la région 5'NC sur les ribosomes et aboutit à la production d'une polyprotéine virale secondairement clivée en protéines matures. La réplication de l'ARN du VHC est réalisée par des complexes de réplication réunissant des protéines virales et cellulaires au sein du réseau membraneux (Miller and Krijnse-Locker, 2008; Moradpour et al., 2007; Wölk et al., 2008). Elle implique la synthèse d'un brin d'ARN(-) qui sert à son tour de matrice pour la synthèse de multiples copies de brins complémentaires ARN(+) (Figure 5) (Lohmann, 2013; Lohmann et al., 1999). Durant cette phase de réplication, des intermédiaires ARN double brins sont générés et pourront être reconnus comme du « non-soi » par le système immunitaire inné (voir chapitre spécifique) (Liang et al., 2009).

Puisque de nombreuses copies de protéines non structurales et structurales sont nécessaires pour répliquer puis encapsider les génomes viraux, la balance entre réplication de l'ARN et traduction en protéines est finement régulée par les protéines de l'hôte et les protéines virales (Lohmann, 2013; 2013).

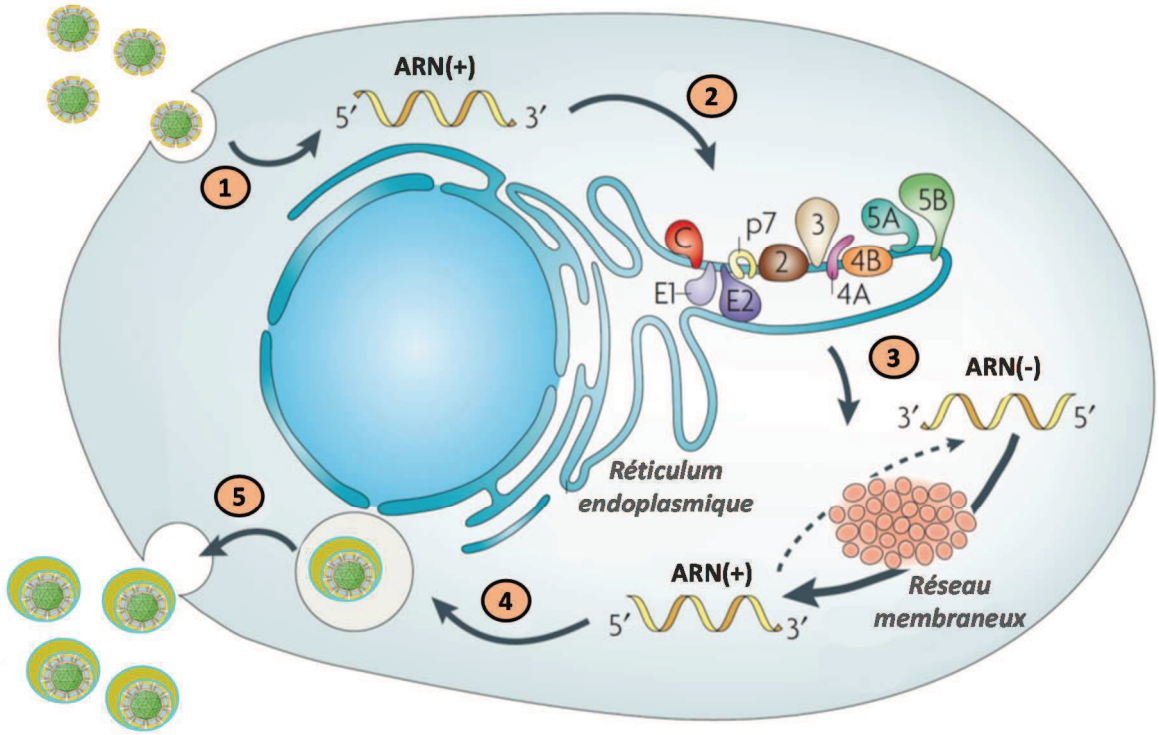


Figure 5 : Cycle de réplication du VHC.

L'entrée du virus dans la cellule aboutit à la libération du génome viral ARN(+) dans le cytoplasme (1). La machinerie cellulaire permet la traduction du génome viral en une polyprotéine secondairement clivée par des protéases cellulaires et virales en protéines matures (2). Au sein du réseau

membraneux, les complexes de réplication formés par les protéines virales et cellulaires assurent la réplication du génome viral ARN(+) via la synthèse d'un brin intermédiaire ARN(-) (3). Les protéines de structure s'auto-assemblent avec les génomes viraux néo-synthétisés pour former des virions. L'association avec des gouttelettes lipidiques et des apolipoprotéines de l'hôte aboutit à la formation de particules lipovirales (4) libérées par exocytose (5). Adapté de (Moradpour et al., 2007).

4.3. Assemblage et libération des particules virales

Comme tous les *Flaviviridae*, les particules du VHC bourgeonnent dans la lumière du réticulum endoplasmique et transitent par des vésicules de sécrétion pour être libérées de la cellule par exocytose (Lindenbach and Rice, 2013). Grâce à son activité de canal ionique, la viroporine p7 permet de neutraliser le pH des vésicules d'exocytose (Wozniak et al., 2010). La formation des particules virales est étroitement liée à l'assemblage des VLDL dans le réticulum endoplasmique. En conséquence, des gouttelettes lipidiques et certaines apolipoprotéines de l'hôte telles que ApoB et ApoE s'associent aux virions néoformés pour générer les particules lipovirales du VHC (Figure 5) (Bartenschlager et al., 2011).

5. Modèles d'étude

5.1. Modèles *in vivo*

5.1.1. Le chimpanzé

Le tropisme d'hôte du VHC est particulièrement étroit, limité avant tout à l'homme et au chimpanzé (Vercauteren et al., 2014). L'histoire naturelle de l'infection par le VHC présente des similitudes entre les deux hôtes. Après inoculation du virus, le chimpanzé présente une virémie rapidement détectable suivie d'une réponse immunitaire innée et adaptative accompagnée d'une cytolyse hépatique.

L'infection expérimentale de chimpanzés a joué un grand rôle dans la découverte du VHC. Elle continue d'être utilisée pour mieux comprendre les interactions du virus avec son hôte et évaluer les antiviraux et les vaccins potentiels lors d'essais précliniques (Barth et al., 2011; Bukh, 2004). Le modèle du chimpanzé présente néanmoins des limites. Bien que l'infection par le VHC puisse évoluer vers la chronicité chez l'animal, le développement de fibroses, de cirrhoses et de carcinomes hépatocellulaires n'est que rarement observé (Vercauteren et al., 2014). En outre, les considérations éthiques, le coût et les contraintes techniques font du chimpanzé un modèle particulièrement difficile à utiliser et reflètent le besoin de disposer de modèles animaux plus adaptés à l'expérimentation en laboratoire.

5.1.2. Modèles murins

Les souris sont naturellement résistantes à l'infection par le VHC. Le développement de modèles murins pour l'étude du VHC impose donc une adaptation du virus ou une adaptation de l'animal. La culture prolongée du VHC sur des hépatocytes exprimant un récepteur CD81 de souris a permis de générer des variants viraux capables d'utiliser efficacement ce récepteur pour entrer dans les cellules (Bitzegeio et al., 2010). Ce résultat suggère que des stratégies visant à adapter expérimentalement le VHC à de nouveaux hôtes sont possibles.

Une autre démarche expérimentale est d'infecter par du virus sauvage des souris transgéniques « humanisées » exprimant certaines protéines humaines telles que des protéines impliquées dans l'entrée du virus. Ces modèles s'avèrent très pertinent pour étudier l'entrée ou certaines étapes de la réplication du virus et pour évaluer l'action de potentielles molécules antivirales (Dorner et al., 2011). En bloquant la réponse immunitaire innée chez des souris « humanisées » exprimant des facteurs d'entrée du virus (CD81 et OCLN), Dorner *et al.* ont récemment proposé un modèle capable de soutenir le cycle réplicatif complet du VHC et de maintenir une virémie détectable pendant plusieurs semaines (Dorner et al., 2013).

Une seconde approche d' « humanisation » des souris consiste à greffer chez l'animal des cellules hépatiques humaines. En xénotransplantant des hépatocytes primaires humains à des souris immunodéficientes et souffrant d'une pathologie hépatique, il est possible de remplacer progressivement les cellules hépatiques de l'animal par les hépatocytes humains. La souris chimère obtenue forme alors un modèle robuste pour étudier la réplication du VHC (Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005). Dans le modèle des souris uPA-SCID, la dégénérescence des hépatocytes murins est assurée par la surexpression de l'urokinase (Mercer et al., 2001). Bien que très utilisé, ce modèle se heurte à un taux de mortalité élevé des souriceaux xénogreffés. Un modèle alternatif est celui des souris FRG dans lequel la dégénérescence hépatique est basée sur l'induction d'une carence en fumaryle acétoacétate hydrolase (FAH), une enzyme du catabolisme de la tyrosine (Bissig et al., 2010; Grompe et al., 1995). Puisqu'ils nécessitent une immunodépression de la souris afin d'éviter le rejet des cellules xénogreffées, les modèles uPA-SCID et FRG ne permettent pas d'étudier l'interaction du virus avec le système immunitaire adaptatif de l'hôte. Pour contourner cette limite, il a récemment été proposé d'injecter simultanément à l'animal des hépatocytes humains et des cellules souches hématopoïétiques humaines $CD34^+$ (Gutti et al., 2014; Washburn et al., 2011). Une telle approche offre l'espoir de pouvoir rapidement étudier les interactions entre le VHC et le système immunitaire adaptatif dans un modèle murin robuste.

5.2. Modèles *in vitro*

5.2.1. Développement des modèles in vitro

Avant la découverte du VHC grâce aux techniques de biologie moléculaire en 1989, de multiples tentatives pour isoler le virus par culture cellulaire avaient été entreprises. Les échecs répétés pour isoler le virus *in vitro* laissaient présager des difficultés auxquelles seraient confrontés les virologues pour développer un modèle cellulaire capable de supporter de hauts niveaux de réplication virale. Bien qu'une sensibilité des hépatocytes primaires et de certaines lignées hépatocytaires aux isolats cliniques du VHC soit parfois observée, le niveau de réplication du virus reste faible et inconstant (Murray and Rice, 2011; Steinmann and Pietschmann, 2013).

Plusieurs stratégies ont successivement été élaborées pour contourner ce problème et pouvoir étudier avec succès les étapes du cycle de multiplication virale. La découverte d'un modèle cellulaire hautement permissif pour le VHC au milieu des années 2000s a constitué un tournant majeur dans l'étude du virus et a ouvert la voie au développement de nouveaux composés thérapeutiques.

5.2.2. Les pseudo-particules du VHC

Les pseudo-particules du VHC (VHCpp) sont des particules chimères obtenues à partir de la co-transfection de trois vecteurs d'expression dans des cellules HEK-293T codant pour : (1) les protéines Gag-Pol d'un rétrovirus (Virus de la leucémie murine ou VIH), (2) les glycoprotéines E1 et E2 du VHC et (3) une protéine rapporteur (GFP ou luciférase). La résultante est une pseudo-particule rétrovirale portant à sa surface les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (Figure 6) (Bartosch et al., 2003a). Une fois introduit dans la cellule, le génome viral est intégré dans le génome de l'hôte. L'expression du gène rapporteur du provirus permet d'évaluer rapidement l'efficacité de l'entrée des VHCpp dans la cellule cible. Les VHCpp sont un système de choix pour étudier les interactions entre les glycoprotéines E1 et E2 du VHC et les facteurs d'entrée de la cellule hôte. Ce sont également des outils très pertinents dans l'étude des anticorps neutralisants capables de reconnaitre les épitopes antigéniques de E1 et E2 (Bartosch et al., 2003b; Fafi-Kremer et al., 2010). A noter néanmoins que les interactions étroites entre les particules de VHC et les lipoprotéines de l'hôte ne sont pas reproduites par ce modèle. Cette limite peut entrainer des biais dans l'étude des interactions du virus avec les protéines cellulaires et/ou les anticorps (Steinmann and Pietschmann, 2013).

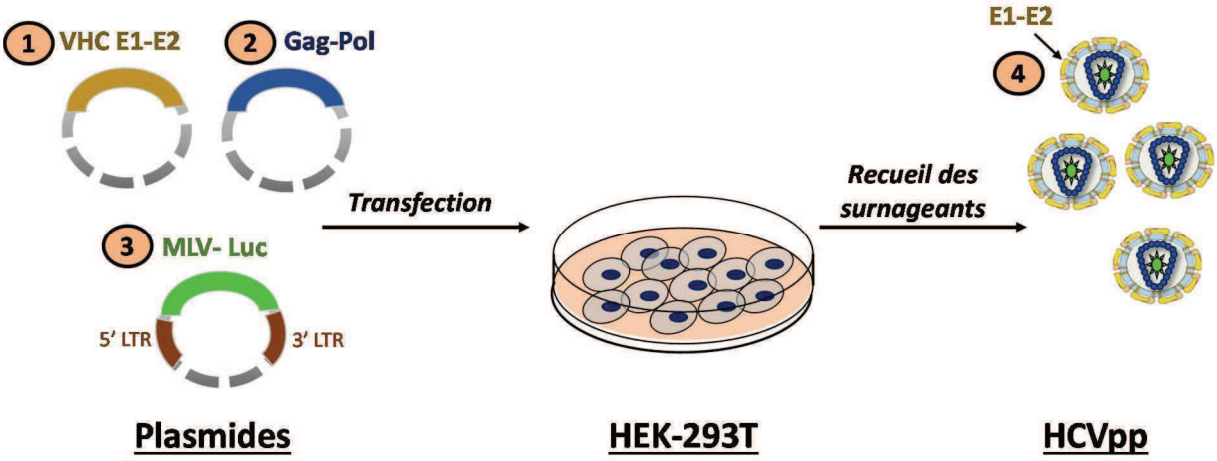


Figure 6 : Modèle des pseudo-particules du VHC (VHCpp).

Les VHCpp sont produites par co-transfection dans des cellules HEK-293T de 3 vecteurs d'expression codant pour : (1) les glycoprotéines d'enveloppe E1-E2 du VHC ; (2) les protéines rétrovirales Gag-Pol, responsables de l'encapsidation de l'ARN viral ; (3) un gène rapporteur dont la protéine est facilement détectable dans la cellule infectée. Ce dernier vecteur contient également les Long Terminal Repeat (LTR) *et les séquences d'encapsidation rétrovirales. Il permet l'intégration du provirus dans le génome de l'hôte et l'encapsidation des ARN viraux. (4) La particule chimère produite exprime à sa surface les glycoprotéines E1 et E2 du VHC.*

5.2.3. Les réplicons

Plusieurs études réalisées sur des *Flavivirus* et des *Pestivirus* ont montré que les protéines de structure ne sont pas indispensables à la réplication de l'ARN viral des *Flaviviridae* (Murray and Rice, 2011). Une approche similaire a donc été entreprise pour le VHC. La délétion de gènes codant pour les protéines de structure (ainsi que *p7* et *NS2*) a permis d'obtenir un génome plus petit dans lequel pouvait être inséré un gène hétérologue (gène de sélection notamment). Le premier réplicon subgénomique proposé par Lohmann *et al.* était composé du gène de résistance de la néomycine sous contrôle de l'IRES du VHC et des gènes non structuraux *NS3- NS5B* du VHC de génotype 1b (isolat Con1) sous contrôle de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) (Figure 7) (Lohmann et al., 1999). D'autres réplicons subgénomiques puis génomiques ont ensuite été proposés (Blight et al., 2003; Kato et al., 2003; Pietschmann et al., 2002). Les transcrits d'ARN issus de ces constructions sont transfectés dans des cellules de la lignée hépatocytaire Huh7 où ils se répliquent de manière autonome sans produire de particules virales infectieuses. Ces systèmes sont des outils précieux pour étudier en détail les étapes de la réplication de l'ARN viral et évaluer de potentiels composés thérapeutiques (Murray and Rice, 2011).

Deux améliorations majeures ont été ajoutées à ce modèle initial de réplicons. D'une part, il a été constaté que certains clones cellulaires étaient plus permissifs vis-à-vis des réplicons et permettaient un meilleur rendement de la réplication virale. L'isolement de ces clones dérivant des cellules Huh7 a été à l'origine du développement des lignées cellulaires Huh7.5 (Blight et al., 2002), Huh7.5.1 (Zhong et al., 2005) et Huh7-Lunet (Friebe et al., 2005). La forte permissivité des lignées Huh7.5 et Huh7.5.1 pourrait être attribuée à un défaut d'activation des mécanismes de défense intracellulaire dû à une mutation sur le gène codant pour la protéine RIG-I (Sumpter et al., 2005). D'autre part, la présence de mutations d'adaptations touchant les gènes viraux *NS3*, *NS4B* et surtout *NS5A* a permis d'augmenter significativement le rendement de réplication des réplicons (Steinmann and Pietschmann, 2013).

Bien que les réplicons du VHC n'aient été longtemps disponibles que pour le génotype 1, de nouveaux réplicons ont récemment été développés pour les génotypes 2, 3, 4, 5 et 6 (Kato et al., 2003; Peng et al., 2013; Wose Kinge et al., 2014; Yu et al., 2013, 2014). Ils offrent des perspectives indiscutables dans le développement et l'évaluation de nouvelles molécules antivirales contre le VHC.

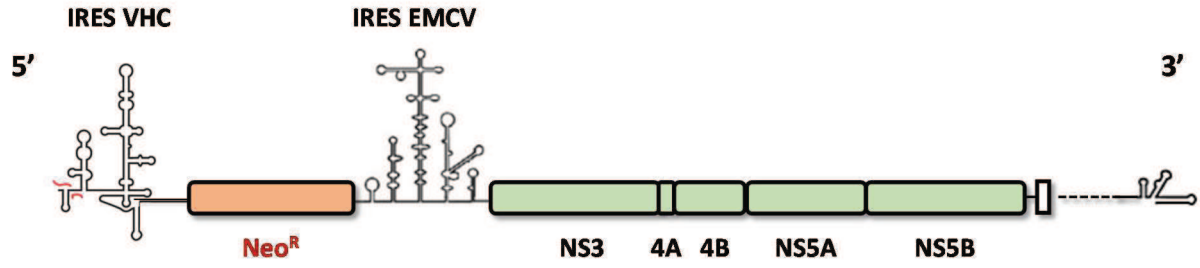


Figure 7 : Modèle de réplicon subgénomique du VHC.
Exemple de réplicon subgénomique bicistronique formé du gène de résistance de la néomycine (Neo^R), permettant de sélectionner les clones réplicatifs, et des gènes non structuraux NS3-NS5B *de l'isolat Con1 du VHC. La traduction du marqueur de sélection Neo^R et des protéines virales est assurée respectivement par l'IRES du VHC et l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). Ce modèle fut le premier réplicon subgénomique proposé par Lohmann* et al. *en 1999 (Lohmann et al., 1999).*

5.2.4. Les particules du VHC produites en culture cellulaire

En 2001, un isolat du VHC de génotype 2a dénommé JFH1 (*Japanese fulminant hepatitis 1* ; Genbank : AB047639) fut isolé chez un patient présentant une hépatite fulminante et utilisé pour construire un nouveau réplicon subgénomique (Kato et al., 2001, 2003). La réplication de ce réplicon dans les cellules Huh7 était particulièrement efficace par rapport au réplicon

Con1 et ne nécessitait pas de pression de sélection antibiotique (Kato et al., 2003). Plus important encore, la transfection du génome entier de l'isolat JFH1 dans des cellules Huh7 aboutissait à la production de particules virales infectieuses, capables d'infecter à la fois des cellules Huh7 naïves, des chimpanzés et des souris xénogreffées en hépatocytes humains (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Ces particules virales produites en culture cellulaires (VHCcc ; *Cell culture-derived HCV, HCVcc*) ont représenté un tournant majeur dans le développement des modèles d'étude du VHC puisqu'ils permettent d'étudier le cycle réplicatif complet du virus. La principale limite de ce système est l'existence d'un seul clone issu d'un seul génotype : JFH1. Pour contourner cette limite, certaines équipes ont développé des génomes chimères combinant des gènes du JFH1 avec des gènes d'autres isolats du VHC. La construction J6/JFH1, assemblant les régions *Core-NS2* de l'isolat J6 (génotype 2a) et *NS3-NS5B* du JFH1, permet d'obtenir des rendements en VHCcc supérieurs au JFH1 (Lindenbach et al., 2005). Des particules virales infectieuses ont également été obtenues en culture cellulaire à partir de génomes viraux de génotypes 1a et 1b mais avec des rendements de réplication inférieurs à ceux du JFH1 (Pietschmann et al., 2009; Yi et al., 2007).

Ainsi, près de 20 ans après la découverte du VHC, un système robuste de production du virus par culture cellulaire a été obtenu. Il a rendu possible l'étude du cycle complet de multiplication virale.

II. L'hépatite C : considérations cliniques

1. Epidémiologie

Entre 115 et 185 millions de personnes dans le monde possèdent des anticorps contre le VHC, soit une séroprévalence mondiale comprise entre 1,6 % et 2,8 % (Gower et al., 2014; Mohd Hanafiah et al., 2013). Le nombre de personnes virémiques (infection active réplicative) a récemment été estimé à 80 millions, avec de fortes disparités selon les pays (Gower et al., 2014). Les prévalences les plus élevées sont observées en Afrique de l'ouest, en Egypte, en Asie centrale, en Russie et dans certains pays d'Europe de l'est (Figure 8A). Plus de la moitié des cas de sujets virémiques serait regroupée dans 6 pays seulement : la Chine, le Pakistan, le Nigéria, l'Egypte, l'Inde et la Russie (Figure 8B). Au sein d'un même pays, la prévalence du VHC peut également varier avec l'âge, l'origine ethnique ou avec certaines pratiques à haut-risque comme l'usage de drogues par voie intraveineuse (IV) (Nelson et al., 2011).

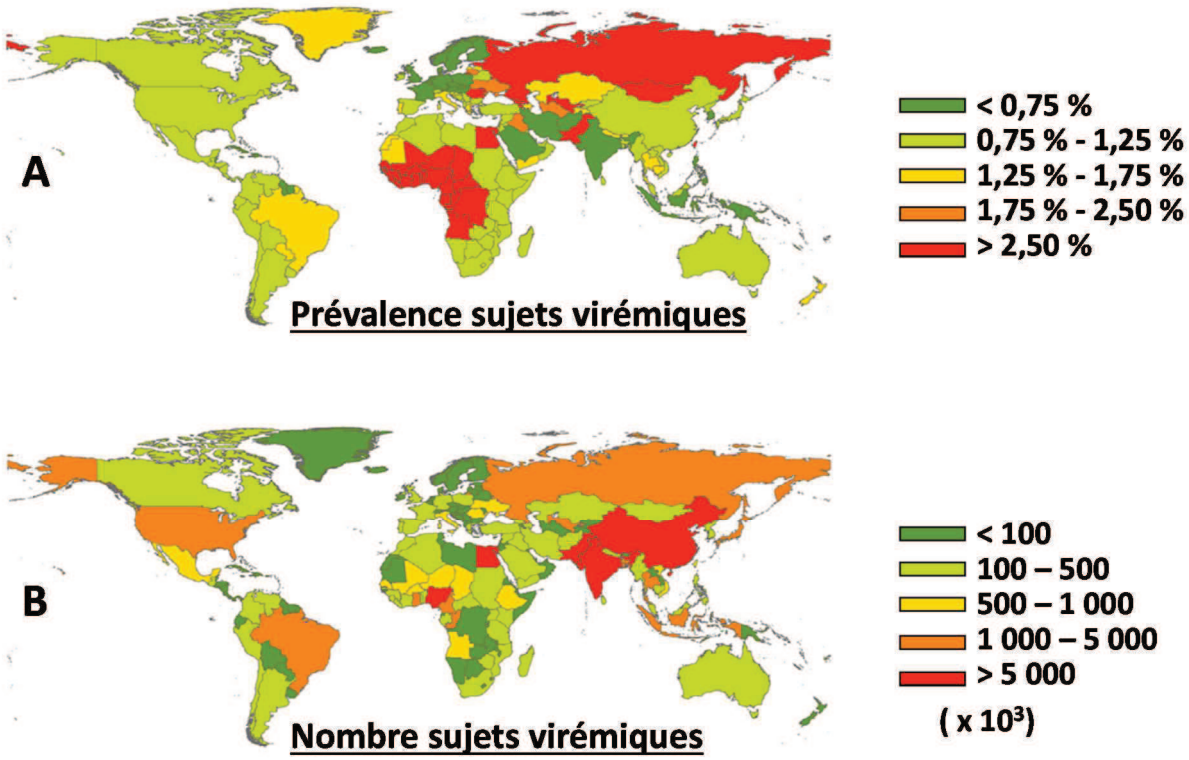


Figure 8 : Répartition mondiale des infections actives à VHC.

(A) Prévalence des virémies rapportées et estimées chez les adultes. (B) Nombre estimé de personnes présentant une virémie à VHC. Adapté de (Gower et al., 2014).

Les génotypes 1 et 3 sont les génotypes prédominants dans le monde, représentant respectivement 46 % et 30 % des cas d'infections par le VHC, suivis par les génotypes 2, 4 et 6 qui regroupent collectivement environ 23 % des cas. Les génotypes 5 et 7 sont minoritaires et principalement observés en Afrique centrale ou du sud (Messina et al., 2014). La répartition des génotypes du VHC est hétérogène au sein de la population mondiale (Figure 9). Les génotypes 1 et 3 sont majoritaires en Europe, Asie, Océanie et sur le continent Américain. Parmi ces génotypes, les sous-types 1a et 3a ont une prévalence élevée associée à l'usage de drogues par voie IV dans les pays occidentaux depuis les années 1960s (Nelson et al., 2011). Le génotype 4 est majoritairement observé dans certaines régions d'Afrique ou du Moyen-Orient tandis que le génotype 6 est surtout présent en Asie du sud-est (Gower et al., 2014; Messina et al., 2014).

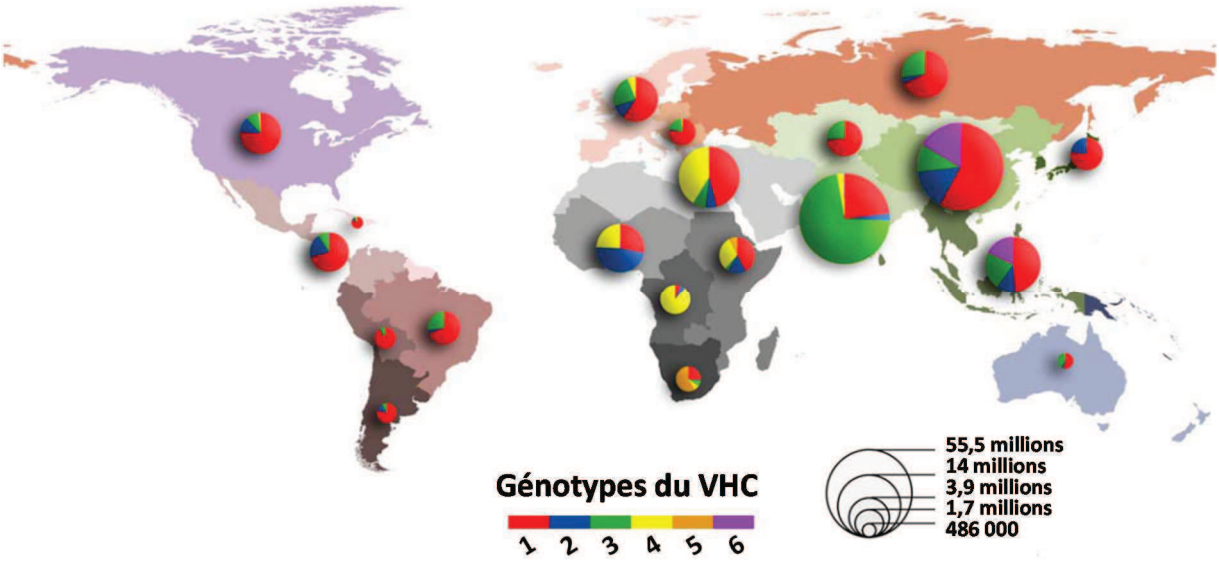


Figure 9 : Distribution des génotypes du VHC dans le monde.
Pour chaque région du monde, la répartition des génotypes 1 à 6 est représentée sous forme d'un diagramme circulaire. La taille des diagrammes est proportionnelle à la séroprévalence estimée du VHC. Compte-tenu du peu de données rapportées, la distribution du VHC de génotype 7 n'est pas mentionnée sur ce schéma. Il serait essentiellement rencontré dans certaines régions d'Afrique centrale et du sud. Adapté de (Messina et al., 2014).

2. Modes de transmission du VHC

2.1. Contamination parentérale et percutanée

L'exposition percutanée ou parentérale à du sang contaminé par le VHC est la première cause de transmission du virus (Thursz and Fontanet, 2014). La transfusion de produits sanguins infectés (avant l'apparition des tests de dépistage) et la réutilisation de seringues souillées ont été à l'origine d'une transmission nosocomiale du VHC qui a favorisé la propagation du virus au cours du XX^{ème} siècle (Esteban et al., 1991; Magiorkinis et al., 2009; Pybus et al., 2001; Thursz and Fontanet, 2014). L'exemple le plus frappant de la transmission iatrogène est probablement celui de l'Egypte. En Egypte, de larges campagnes d'injections de sels d'antimoine destinées à lutter contre la leishmaniose viscérale dans les années 1930s - 1950s ont été à l'origine d'une contamination massive et sans précédent d'une partie de la population par le VHC via la réutilisation d'aiguilles non stérilisées (Frank et al., 2000). En Europe, l'administration d'immunoglobulines anti-D pour prévenir l'iso-immunisation rhésus fut également à l'origine de cas groupés de transmission du VHC (Kenny-Walsh, 1999). Enfin, comme pour le VIH, l'administration de facteurs de coagulation obtenus à partir de produits sanguins poolés a été à l'origine de la contamination de patients hémophiles (Makris et al.,

1990). Avec l'apparition des tests de dépistage du VHC et avec le respect des règles d'hygiène autour des seringues usagées en milieux de soins, de telles contaminations iatrogènes ou nosocomiales du VHC sont aujourd'hui exceptionnelles dans les pays développés mais elles persistent dans certains pays en voie de développement (Tagny et al., 2008; Thursz and Fontanet, 2014). De la même manière, l'incidence des contaminations par le VHC chez les patients hémodialysés a considérablement chuté en France (Sauné et al., 2011). En contextes de soins, l'exposition accidentelle du personnel à du sang contaminé lors de la manipulation d'aiguilles souillées reste une source de contaminations par le VHC (Nienhaus et al., 2012).

Parallèlement à ces situations de soins, le mésusage des seringues pour l'injection de drogues par voie intraveineuse a indiscutablement et très largement contribué à la dissémination du virus. L'usage de drogues IV est actuellement le principal mode de contamination par le VHC dans les pays développés (Magiorkinis et al., 2009; Nelson et al., 2011; Pybus et al., 2001; Thursz and Fontanet, 2014). Environ 16 millions de personnes dans le monde seraient des usagers de drogues IV (Mathers et al., 2008). La prévalence de l'infection par le VHC chez ces usagers varie de 60 % à plus de 80 % selon les pays (Nelson et al., 2011). Les génotypes 1a et 3a sont particulièrement impliqués.

Enfin, certaines pratiques rituelles ou esthétiques utilisant des objets piquants, coupants ou tranchants sans mesures d'hygiènes adaptées comme la scarification, la circoncision, le piercing ou le tatouage sont également à risque de contamination par le VHC (Pybus et al., 2001; Thursz and Fontanet, 2014; 2013).

2.2. Autres modes de contamination

La transmission du VHC par voie sexuelle est possible bien que sa fréquence soit controversée. Plusieurs études ont démontré que la transmission du VHC entre partenaires hétérosexuels réguliers est très rare, avec une incidence d'environ 1/190 000 contacts sexuels (Terrault et al., 2013; Tohme and Holmberg, 2010). La transmission sexuelle du VHC est par contre favorisée dans le cas de partenaires sexuels multiples, lors de rapports sexuels à haut risque, chez les sujets homosexuels masculins et surtout chez les personnes co-infectées par le VIH (Thursz and Fontanet, 2014; Tohme and Holmberg, 2010). Les sujets homosexuels masculins infectés par le VIH et ayant de multiples partenaires sexuels sont les plus à risque de transmission sexuelle du VHC (van de Laar et al., 2009).

La transmission materno-fœtale peut survenir dans 2 à 10 % des cas (Mast et al., 2005). Le risque le plus élevé est observé chez les mères présentant des virémies élevées à VHC, co-

infectées par le VIH, ou lors de la rupture prolongée des membranes (Mast et al., 2005; Thomas et al., 1998).

3. Histoire naturelle de l'infection

3.1. Hépatite aiguë

L'hépatite C aiguë survient après une période d'incubation d'environ 7 semaines (Mosley et al., 2005). Elle est le plus souvent asymptomatique. Chez une minorité de patients, on observe des symptômes d'hépatite virale aiguë avec asthénie, anorexie, nausées, douleurs abdominales et ictère (Cox et al., 2005a; Mosley et al., 2005). L'hépatite fulminante liée au VHC est rare (Maheshwari et al., 2008). Chez une majorité de sujets, le seul signe d'infection aiguë par le VHC est l'élévation des transaminases qui témoigne de la cytolyse hépatique. Celle-ci survient après le pic initial de virémie, ce qui suggère que la lyse des hépatocytes infectés est avant tout due au déclenchement de la réponse immunitaire antivirale de l'hôte (Figure 10).

La clairance spontanée du VHC au cours des 6 premiers mois de l'infection survient chez environ 30 % des patients. Elle est plus fréquemment observée lors des infections symptomatiques et chez les patients qui possèdent un génotype « protecteur » sur le locus *IL28B* (Gerlach et al., 2003; Thomas et al., 2009).

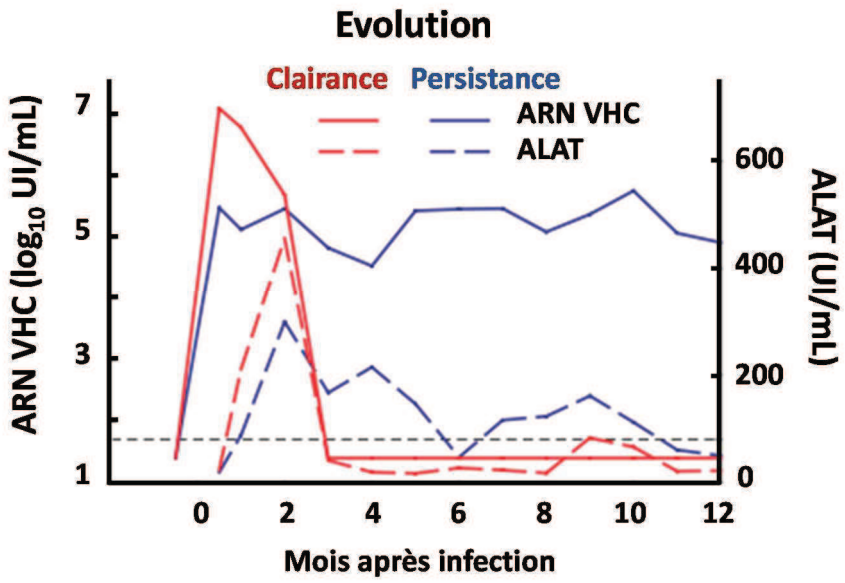


Figure 10 : Profils d'évolution de l'hépatite C aiguë.

Après une incubation de 1 à 16 semaines, le génome viral est détectable dans le sang (traits pleins

bleu et rouge). Le pic de virémie précède le pic d'élévation des transaminases hépatiques (traits discontinus bleu et rouge). Chez 30 % des patients, l'élimination du virus se traduit par la disparition de la virémie au cours des 6 premiers mois. La persistance de la virémie au-delà de 6 mois marque le passage à la chronicité (traits bleus). Au cours de l'hépatite C chronique, la charge virale est élevée. L'augmentation des transaminases hépatiques est variable entre les patients et chez un même patient. ALAT : alanine aminotransférase.

3.2. Hépatite chronique et complications

Dans 70 % des cas, l'infection par le VHC devient chronique (2013). La persistance du VHC est associée à une inflammation chronique du foie et à la production anormale de protéines de la matrice extracellulaire, à l'origine d'une fibrose hépatique. La virémie est typiquement élevée (5-7 $\log_{10}$ UI/ml) et associée à une élévation des transaminases hépatiques d'intensité variable (Figure 10) (Wilson et al., 2006). L'évolution des lésions hépatiques est variable selon les patients. Dans le cas des formes actives de la maladie, l'extension de la fibrose et le développement de nodules de régénération hépatiques sont à l'origine d'une cirrhose. Celle-ci est observée chez 5 à 20 % des patients après 20 à 30 ans d'évolution de l'infection chronique (Figure 11). A ce stade, les principaux risques évolutifs sont la décompensation de la cirrhose et le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Sangiovanni et al., 2006). Le VHC est responsable d'environ 25 % des CHC dans le monde (Perz et al., 2006) et est à l'origine de 30 % des transplantations hépatiques dans les pays développés (Kim et al., 2009).

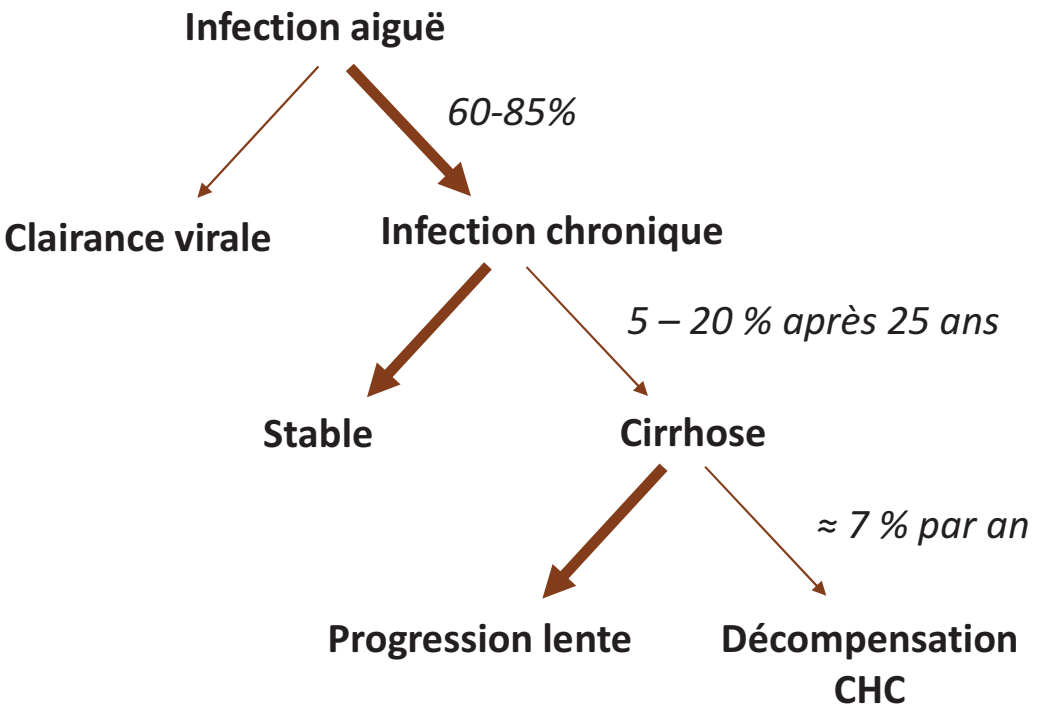


Figure 11 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC.

L'infection par le VHC aboutit à une hépatite chronique chez une majorité de patients. L'hépatite C chronique est le plus souvent stable mais peut évoluer vers la formation d'une cirrhose dans les formes les plus actives de la maladie. L'évolution de la cirrhose peut être lente chez la majorité des malades ou évoluer vers une décompensation ou vers la formation d'un carcinome hépatocellulaire (CHC).

En plus de ces lésions hépatiques, l'infection chronique par le VHC peut être associée à des perturbations métaboliques telles qu'une insulino-résistance, un diabète de type 2, des troubles lipidiques ou une stéatose hépatique (Mehta et al., 2003; Negro, 2010; Sheikh et al., 2008). Bien que le foie soit l'organe cible du VHC, un certain nombre de manifestations extra-hépatiques sont observables lors de l'infection chronique telles qu'une cryoglobulinémie mixte, une porphyrie hépatique (*porphyria cutanea tarda*) ou des thyroïdites (Mayo, 2003).

4. Diagnostic biologique de l'hépatite C

4.1. Diagnostic direct

Détection et quantification de l'ARN du VHC

La présence d'ARN du VHC dans le sang périphérique témoigne de la réplication virale. La virémie est détectable dès 1 à 3 semaines après l'exposition au virus et persiste au-delà de 6 mois en cas d'infection chronique. La RT-PCR quantitative est l'examen de choix pour diagnostiquer l'infection active et surveiller la réponse virologique aux traitements (Chevaliez, 2011). Les tests commerciaux atteignent actuellement des limites de détection inférieures à 10 ou 15 UI/ml.

Détection antigénique du VHC

La détection de l'antigène de capside du VHC dans le sang circulant offre une moins grande sensibilité que la RT-PCR. Elle trouve néanmoins son intérêt dans des tests sérologiques de dépistage combinés en permettant de détecter l'infection un peu plus précocement que les tests basés sur la recherche isolée des anticorps anti-VHC.

Génotypage et recherche de mutations de résistance

Le séquençage d'une ou de plusieurs régions génomiques du VHC permet un typage et un sous-typage du virus. Les génotypes du VHC sont associés à des différences dans l'évolution de la maladie et dans la réponse aux traitements (Simmonds et al., 2005). Le génotypage viral est donc nécessaire pour orienter la stratégie thérapeutique à adopter pour chaque patient (European Association for the Study of the Liver, 2014).

Le développement d'antiviraux à action directe sur le virus (*Direct-Acting Antivirals*, DAAs) expose au risque d'échappement viral via la sélection de mutations de résistance sur la région cible. La recherche des mutations de résistance chez les patients en échec thérapeutique ou non-répondeurs au traitement pourrait aider le clinicien dans son choix thérapeutique. Sa place reste néanmoins à préciser (European Association for the Study of the Liver, 2014)

Certaines variations génétiques sur le locus *IL28B* de l'hôte sont corrélées à la clairance virale spontanée et sous traitement (Ge et al., 2009; Thomas et al., 2009). Le génotypage du gène *IL28B* aide à prédire l'efficacité du traitement lors de stratégies thérapeutiques basées sur l'association d'IFN-α pégylé et de ribavirine (European Association for the Study of the Liver, 2014).

4.2. Diagnostic indirect

La recherche des anticorps anti-VHC est l'examen de première intention pour le dépistage de l'hépatite C. En cas de positivité, la recherche de l'ARN du VHC dans le sang est indispensable pour déterminer le statut virologique du patient (European Association for the Study of the Liver, 2014). Les anticorps anti-VHC apparaissent en moyenne 2 à 8 semaines après le début de la phase aiguë de l'infection et persistent toute la vie en cas d'infection chronique. La détection des anticorps anti-VHC utilise des techniques de dosages immuno-enzymatiques sur différents supports solides (microplaques et microbilles par exemple). Elle est le plus souvent automatisée (Chevaliez, 2011).

5. Traitements de l'hépatite C et approches vaccinales

5.1. Traitements de l'hépatite C

L'objectif du traitement contre l'hépatite C est d'obtenir une réponse virologique soutenue (RVS) définie par une charge virale indétectable 12 (RVS12) ou 24 (RVS24) semaines après la fin du traitement. La RVS est alors prédictive de l'élimination du virus dans plus de 99% des cas (European Association for the Study of the Liver, 2014). Jusqu'en 2011, le traitement de l'hépatite C chronique était basé sur l'association de l'IFN-α pégylé (PEG-IFN) et de la ribavirine pendant 24 ou 48 semaines (European Association for the Study of the Liver, 2011). Les taux de RVS obtenus avec ce schéma thérapeutique atteignaient 70 à 80 % chez les patients infectés par un VHC de génotypes 2 ou 3 mais n'étaient que de 50 % chez les patients atteints par un virus de génotypes 1 ou 4 (Manns et al., 2006; Scheel and Rice, 2013). En plus de son efficacité incomplète, le traitement basé sur l'association PEG-IFN / ribavirine induit des effets secondaires notables qui le rendent difficile à supporter pour les patients (Manns et al., 2006).

Le développement d'antiviraux à action directe sur le VHC (*Direct-Acting Antivirals*, DAAs), ciblant les protéines du virus, a constitué un tournant majeur dans l'histoire de l'hépatite C. Au moins 35 molécules sont actuellement commercialisées ou en cours d'essais thérapeutiques de phase II ou III (Pawlotsky, 2014).

Inhibiteurs de la protéase NS3-NS4A :

Les inhibiteurs de la protéase **NS3-NS4A** ont été les premiers DAAs commercialisés. Ces composés sont des peptido-mimétiques qui se fixent sur le site catalytique de l'enzyme et bloquent son action de clivage de la polyprotéine virale. Le telaprevir (Vertex/Janssen) et le

boceprevir (Merck) ont été les deux premiers inhibiteurs approuvés en Europe et aux Etats-Unis. Leur association au traitement PEG-IFN / ribavirine permet d'obtenir des taux de RVS de 70 % chez les patients infectés par un VHC de génotype 1 (Jacobson et al., 2011; Poordad et al., 2011). Ce schéma a néanmoins quelques limites liées au nombre de prises journalières et aux effets secondaires du traitement, à types d'anémies ou d'éruptions cutanées en particulier (Liang and Ghany, 2013). Un autre inconvénient de ces deux molécules est leur faible barrière génétique, à l'origine de mutations de résistance sur les gènes *NS3-NS4A* (Pawlotsky, 2014). De nouveaux inhibiteurs de protéase dits de « 2ème génération » présentent une barrière génétique plus élevée et possèdent un spectre antiviral plus large contre les différents génotypes du VHC (Pawlotsky, 2014).

Inhibiteurs de la polymérase NS5B :

Deux types d'inhibiteurs de l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B ont été proposés : les analogues nucléos(t)idiques et les inhibiteurs allostériques. Les analogues nucléos(t)idiques ont l'avantage de posséder un spectre d'action large contre tous les génotypes du VHC et ont une barrière génétique élevée. Parmi ces molécules, le sofosbuvir (Gilead) est actuellement proposé dans des schémas thérapeutiques de première intention contre l'ensemble des VHC de génotypes 1 à 6, y compris dans des associations dépourvues de PEG-IFN (European Association for the Study of the Liver, 2014). Le taux de RVS atteint avec ces combinaisons thérapeutiques au cours des essais cliniques de phase III avoisinait les 90 % (European Association for the Study of the Liver, 2014).

Les inhibiteurs allostériques de NS5B sont actuellement en cours d'essais thérapeutiques de phases II ou III (Pawlotsky, 2014). Ils agissent en modifiant la conformation de la polymérase NS5B, ce qui bloque son action catalytique.

Les inhibiteurs de NS5A :

Ces molécules se fixent sur la protéine NS5A et bloquent sa capacité de régulation de la réplication virale. Elles sont actives contre les VHC de génotypes 1 et 4 mais leur efficacité sur les génotypes 2 ou 3 est variable (Pawlovsky, 2014). Le daclatasvir (Bristol-Myers Squibb) a été le premier inhibiteur de NS5A commercialisé. La bithérapie par daclatasvir et sofosbuvir a récemment permis d'atteindre des taux de RVS de 89 à 98 % chez les patients chroniquement infectés par des VHC de génotypes 1 à 3 (Sulkowski et al., 2014)

Les agents ciblant l'hôte (Host-targeting agents, HTAs) :

A la différence des DAAs qui ciblent spécifiquement une protéine virale, certaines molécules sont actives sur l'infection par le VHC en agissant sur des facteurs de l'hôte (*Host-targeting agents, HTAs*) nécessaires à la réplication virale. Ainsi, le blocage de la cyclophiline A (CypA) par l'alisporivir (Novartis) ou du micro-ARN miR-122 par le miravirsen (Santaris) pourrait favoriser le contrôle de la réplication virale *in vivo* (Guedj et al., 2014; Lanford et al., 2010).

Les protéines d'entrée du VHC dans la cellule hôte sont également des cibles thérapeutiques intéressantes. Le blocage de l'entrée du virus pourrait notamment trouver son intérêt chez les patients transplantés hépatiques afin d'éviter la réinfection précoce du greffon par le VHC. De plus, les inhibiteurs d'entrée permettent de bloquer la transmission du VHC de cellule à cellule. Ils pourraient ainsi lutter efficacement contre la propagation de variants viraux résistants aux DAAs dans le foie des patients (Fofana et al., 2014; Xiao et al., 2014).

5.2. Approches vaccinales

Malgré plus de 20 ans de recherches, aucun vaccin contre le VHC n'est actuellement commercialisé. L'élaboration d'un vaccin contre le VHC se heurte à des obstacles importants comme le manque de modèles animaux robustes et facilement manipulables en laboratoire ou encore la grande capacité du virus à échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. Pourtant, l'élimination spontanée du virus par le système immunitaire chez une partie des patients infectés soutient l'idée qu'un vaccin prophylactique et/ou thérapeutique efficace pourrait être développé. Plusieurs vaccins candidats ont été proposés à ce jour et testés lors d'essais précliniques et/ou cliniques de phases I ou II. Ils sont basés à la fois sur différentes combinaisons d'antigènes du VHC et sur différents systèmes de délivrance dans l'organisme (Fauvelle et al., 2013; Liang, 2013). Une première approche est l'administration de protéines recombinantes du VHC, avec ou sans adjuvant, destinée à déclencher une réponse immunitaire contre le virus. L'administration des glycoprotéines virales E1-E2 associées à l'adjuvant MF59C.1 (Frey et al., 2010) ou celle de la protéine Core associée à l'Iscomatrix™ (Drane et al., 2009) ont entrainé le développement d'une réponse adaptative humorale et cellulaire dirigée contre les protéines virales lors d'essais cliniques de Phase I, ce qui suggère que cette approche vaccinale pourrait être efficace contre le VHC. Une autre stratégie est de stimuler le système immunitaire grâce à des particules *virus-like* qui expriment certaines protéines virales du VHC mais qui ne contiennent pas le génome viral. Plusieurs de ces constructions ont été testées lors d'essais précliniques chez la souris ou chez des primates non-humains et ont démontré une capacité à déclencher une réponse immunitaire robuste contre le virus (Garrone et al., 2011; Murata et al., 2003) voire même à faciliter le contrôle

de l'infection lors d'un contact ultérieur avec le VHC (Elmowalid et al., 2007). Une autre possibilité est d'utiliser des vecteurs viraux modifiés (principalement des poxvirus ou des adénovirus) codant pour des protéines du VHC. Cette approche offre l'avantage d'être très immunogène et d'induire une forte réponse des lymphocytes T. Au cours d'un essai clinique de phase I, une combinaison de vecteurs adénovirus (*human adenovirus 6* et *chimpanzee adenovirus 3)* codant pour des protéines non structurales du VHC de génotype 1b a permis d'obtenir une réponse lymphocytaire T $CD4^+$ et $CD8^+$ soutenue, dirigée contre de multiples épitopes du VHC et capable de reconnaitre des souches hétérologues du VHC (génotypes 1a et 3a) (Barnes et al., 2012). Des études de phase II sont actuellement menées pour confirmer ces résultats enthousiasmants (NCT01436357).

Les nouvelles molécules antivirales offrent des perspectives de succès thérapeutiques sans précédent contre le VHC. Si le développement de ces nouveaux traitements constitue un succès scientifique et médical indiscutable, leur administration chez le patient nécessite une prise en charge médicale adaptée et se heurte à un prix de commercialisation particulièrement élevé qui risque d'entraver leur utilisation dans les pays les plus pauvres. Le développement de thérapeutiques moins onéreuses et surtout de vaccins prophylactiques et/ou thérapeutiques reste plus que jamais nécessaire pour espérer éradiquer l'hépatite C (Fauvelle et al., 2013). Un prérequis indispensable pour espérer atteindre cet objectif est la compréhension détaillée des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'échappement immunitaire et dans la persistance du VHC lors de l'infection chronique.

III. Réponse immunitaire contre le VHC

1. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire de l'hôte à l'invasion par le VHC est déclenchée rapidement lors de l'infection. L'immunité cellulaire intrinsèque des hépatocytes est la première ligne de défense contre le virus.

Déclenchement de la réponse innée

Pour se défendre contre les agents pathogènes, les cellules de l'hôte possèdent des récepteurs membranaires et cytoplasmiques capables de détecter des motifs moléculaires anormalement présents (*pathogen-associated molecular patterns,* PAMPs) et de les associer à du « non-soi ». Parmi ces *pattern recognition receptors* (PRRs), certains membres des

récepteurs *Toll-like* (TLRs) et *RIG-I-like* (RLRs) jouent un rôle déterminant dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux (Wu and Chen, 2014). L'engagement des PAMPs viraux sur ces récepteurs entraine le recrutement des protéines adaptatrices TRIF et MyD88 dans le cas des TLRs, et MAVS dans le cas des RLRs. En aval, l'activation de facteurs de transcription tels que IRF-3, IRF-7 et NF-κB aboutit à l'expression d'un panel de gènes impliqués dans la défense immunitaire.

Comme tout agent pathogène, le VHC possède des PAMPs tels que les ARN doubles brins générés pendant la réplication du génome, l'extrémité 5' triphosphate, l'IRES, ou encore le motif polyuridine en 3' (polyU/UC) (Schnell et al., 2012; Shimoike et al., 2009). Les récepteurs cytosoliques RIG-I et PKR (protéine kinase R) et le récepteur endosomique TLR-3 ont été particulièrement impliqués dans la reconnaissance de ces motifs moléculaires du VHC (Arnaud et al., 2011; Loo and Gale, 2011; Wang et al., 2009). Le signal cellulaire initié par l'activation de ces récepteurs conduit à la transcription des gènes codant pour les IFNs de types I et III et pour certaines cytokines pro-inflammatoires (Figure 12 A). Les IFNs de types I et III produits puis secrétés se fixent sur leurs récepteurs spécifiques exprimés à la surface de la cellule infectée (action autocrine) et sur les cellules environnantes (action paracrine). L'engagement des IFNs sur leurs récepteurs active les voies JAK-STAT et déclenche la transcription d'un panel de gènes stimulés par les IFNs (*Interferon-stimulated genes*, ISGs) tels que les gènes codant pour la 2'-5' oligoadénylate synthétase (OAS) ou pour l'*interferon regulatory factor 1* (IRF-1) (Figure 12 B) (Horner and Gale, 2013). Les produits de ces gènes facilitent la clairance du virus dans les cellules infectées et protègent les cellules saines adjacentes de l'invasion virale (Schneider et al., 2014). La libération des IFNs de types I et III joue donc un rôle majeur dans le déclenchement et l'amplification du signal de défense mis en place par la cellule infectée. De plus, la reconnaissance de l'agent pathogène aboutit à la libération de cytokines qui favorisent l'activation d'une réponse immunitaire innée plus globale pour lutter contre l'infection.

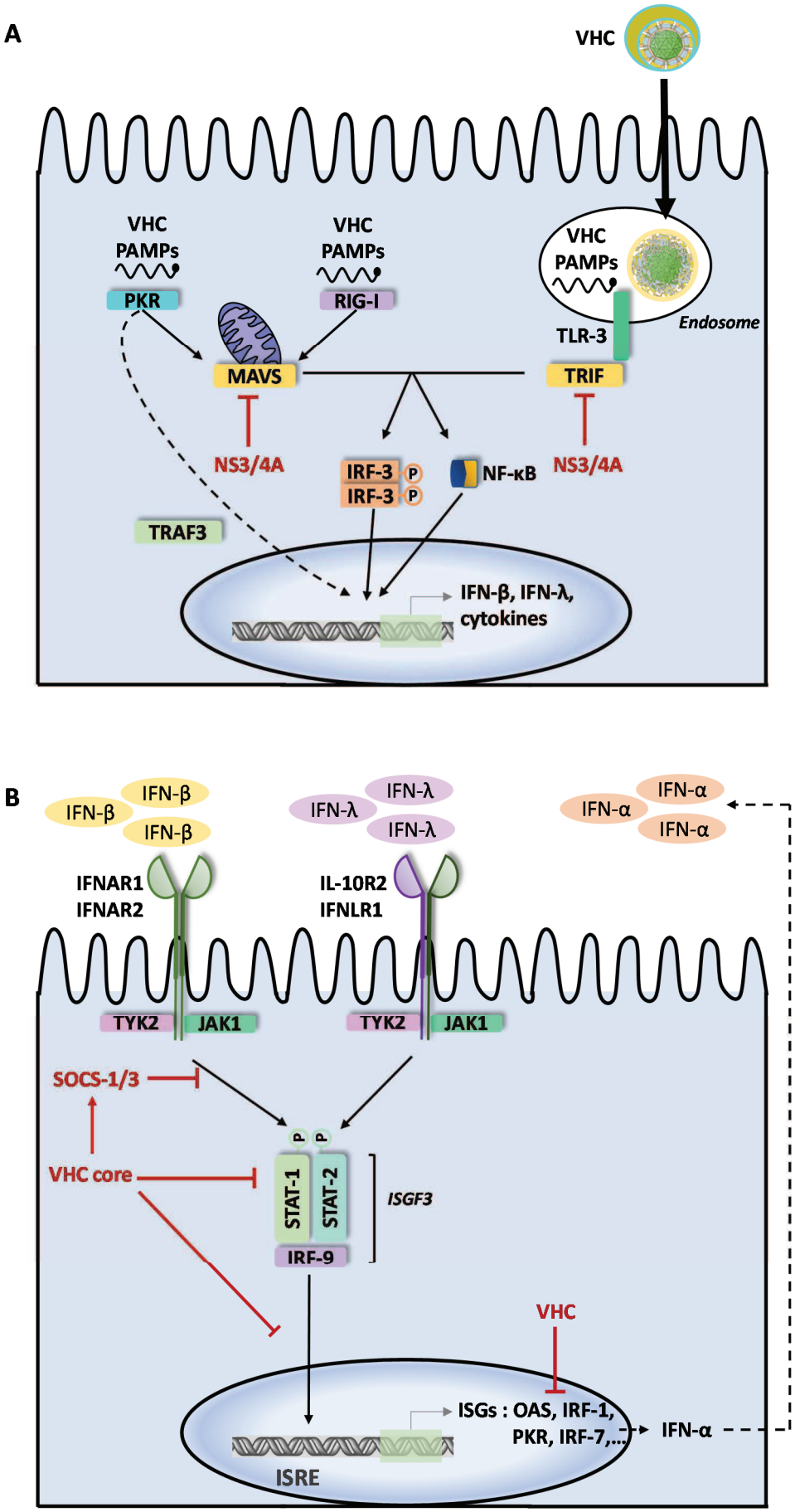

A
VHC
VHC PAMPs
PKR
VHC PAMPs
RIG-I
VHC PAMPs
Endosome
TLR-3
MAVS
TRIF
NS3/4A
NS3/4A
IRF-3
IRF-3
NF-κB
TRAF3
IFN-β, IFN-λ, cytokines
B
IFN-β
IFN-β
IFN-β
IFN-λ
IFN-λ
IFN-λ
IFN-α
IFN-α
IFN-α
IFNAR1
IFNAR2
IL-10R2
IFNLR1
TYK2
JAK1
TYK2
JAK1
SOCS-1/3
VHC core
STAT-1
STAT-2
ISGF3
IRF-9
VHC
ISGs : OAS, IRF-1, PKR, IRF-7,...
IFN-α
ISRE

Figure 12 : Déclenchement de la réponse immunitaire innée.

(A) *La détection des motifs moléculaires associés au VHC (PAMPs) par les protéines TLR-3, RIG-I et PKR entraine le recrutement des protéines adaptatrices TRIF et MAVS, l'activation des facteurs de transcription IRF-3 et NF-κB, et la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, pour l'IFN-β et pour l'IFN-λ. La protéase NS3-NS4A du VHC clive les protéines adaptatrices TRIF et MAVS.* ***(B)*** *Les IFN-β et -λ ainsi libérés stimulent la cellule infectée et les cellules adjacentes en se fixant sur leurs récepteurs et en activant la voie JAK-STAT, conduisant à la transcription d'ISGs et à la libération d'IFN-α. La protéine core du VHC inhibe l'activation de STAT-1 et l'action du complexe ISGF3 et stimule les protéines SOCS-1 et 3. D'autres protéines du VHC inhibent l'action des produits des ISGs.*

Rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (*Dendritic cells*, DCs) agissent en chefs d'orchestre de la réponse antivirale en induisant une grande quantité de cytokines sur le site de l'infection et en présentant les antigènes viraux aux lymphocytes T pour déclencher la réponse immunitaire adaptative (Lambotin et al., 2010). Lors de la rencontre avec un antigène viral, les cellules dendritiques peuvent induire une immunité protectrice médiée par la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IL-15 dans le cas des DCs myéloïdes (mDCs) et les IFNs de type I dans le cas des DCs plasmacytoïdes (pDCs). La capture des antigènes viraux entraine la maturation des DCs et leur migration vers les ganglions lymphatiques loco-régionaux. Là, l'antigène viral est présenté aux lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$) et cytotoxiques ($CD8^+$) (Figure 13). En fonction des cytokines qu'elles libèrent et des molécules de co-stimulation qu'elles expriment, les DCs orientent la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en lymphocytes Th1 producteurs d'IFN-γ ou en populations de cellules T alternatives telles que les lymphocytes Th2, Th17 ou T régulateurs (Tregs). Le profil d'activation des lymphocytes T $CD8^+$ est également médié par les DCs. En conséquence, les DCs jouent un rôle central dans le déclenchement d'une réponse adaptative robuste visant à éliminer l'antigène viral ou, au contraire, dans le développement d'une tolérance immunitaire (Steinman, 2012).

Rôle des cellules Natural killer (NK)

Les IFNs de type I et les cytokines pro-inflammatoires libérées par les différentes sous-populations de DCs contribuent à stimuler les cellules *Natural Killer* (NK). Les cellules NK sont des effecteurs cellulaires majeurs de l'immunité antivirale innée, capables de lyser les hépatocytes infectés par le VHC et de libérer des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ (Figure 13) (Cheent and Khakoo, 2011). L'environnement cytokinique induit par les

DCs et les cellules NK est un déterminant majeur dans le développement d'une réponse adaptative robuste capable d'éliminer le VHC (Cheent and Khakoo, 2011; Zhou et al., 2012).

2. Réponse immunitaire adaptative

2.1. Immunité cellulaire contre le VHC

De nombreux arguments plaident en faveur du rôle central de la réponse adaptative cellulaire médiée par les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans la clairance du VHC (Rehermann, 2009; Thimme et al., 2012).

Les lymphocytes T $CD4^+$

Au cours de la phase aiguë de l'infection, la clairance spontanée du VHC a été associée au développement d'une réponse immunitaire intense, polyclonale et durable de la part des lymphocytes T $CD4^+$ (Kaplan et al., 2007)(Kaplan et al. 2007). A l'inverse, la perte de l'intensité de la réponse T $CD4^+$ ou de la diversité des épitopes ciblés favorise le développement d'une infection persistante (Gerlach et al., 1999; Kaplan et al., 2007; Schulze Zur Wiesch et al., 2012; Urbani et al., 2006). Il a également été démontré que la déplétion en lymphocytes T $CD4^+$ chez des chimpanzés infectés altère le développement d'une réponse cytotoxique efficace médiée par les lymphocytes T $CD8^+$ et favorise l'échappement immunitaire du virus (Grakoui et al., 2003).

Les lymphocytes T $CD8^+$

Les lymphocytes T $CD8^+$ sont les effecteurs majeurs de la réponse cellulaire adaptative. Chez les personnes qui parviennent à éliminer le virus, le pic de lymphocytes T $CD8^+$ est détectable dans le sang environ 8 à 12 semaines après le début de l'infection et précède le déclin de la charge virale (Lechner et al. 2000; Lauer et al. 2005). De la même manière, une accumulation de lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques anti-VHC est observée dans le foie de chimpanzés infectés et coïncide avec le début de l'hépatite et le déclin de la virémie (Thimme et al., 2002). Expérimentalement, il a été observé que la déplétion en lymphocytes T $CD8^+$ chez le chimpanzé entrainait une virémie élevée et persistante. Le déclin de la virémie puis la clairance virale intervenaient uniquement après la récupération d'un taux adapté de lymphocytes T $CD8^+$ anti-VHC dans le foie de l'animal (Shoukry et al., 2003). Cette observation suggère que les lymphocytes T $CD8^+$ sont des cellules clés de la réponse immunitaire contre le VHC. Les lymphocytes T $CD8^+$ anti-VHC produisent des cytokines pro-

inflammatoires telles que l'IFN-γ et lysent les cellules infectées via la libération de perforines et la stimulation des voies apoptotiques extrinsèques (Jo et al., 2009, 2012). Comme dans le cas des lymphocytes T $CD4^+$, le caractère intense, polyclonal et durable de la réponse lymphocytaire T $CD8^+$ favorise la clairance virale (Rehermann, 2009; Thimme et al., 2012). Certaines études réalisées chez les usagers de drogues par voie IV ont mis en évidence une corrélation entre le nombre d'épitopes viraux reconnus par les lymphocytes T $CD8^+$ lors de l'infection aiguë et l'évolution de l'infection (Cox et al., 2005b). D'autres équipes ont souligné l'importance du maintien de cette réponse polyclonale dans le temps pour contenir efficacement l'infection par le VHC (Grakoui et al., 2003; Lechner et al., 2000; Rehermann et al., 1996; Shoukry et al., 2003)(Rehermann et al., 1996).

Chez les sujets qui parviennent à éliminer le VHC, des lymphocytes T mémoires $CD4^+$ et $CD8^+$ persistent et sont rapidement mobilisés en cas de nouvelle exposition au virus. Ils n'empêchent cependant pas totalement la survenue d'une réinfection par le VHC (Bassett et al., 2001; Dahari et al., 2010; Grakoui et al., 2003; Osburn et al., 2010).

2.2. Immunité humorale contre le VHC

A la différence de la réponse adaptative cellulaire, l'impact de la réponse humorale au cours de l'infection par le VHC a longtemps été considéré comme mineur. Chez les patients immunocompétents, l'apparition des anticorps anti-VHC est détectable lors de la phase aiguë et précède généralement le pic d'élévation des transaminases (Fauvelle et al., 2013; Neumann-Haefelin and Thimme, 2013). Cependant, seule une petite partie de ces anticorps est réellement « neutralisante » et prévient l'entrée du virus dans la cellule cible et la dissémination virale.

Un faisceau d'arguments cliniques et expérimentaux plaide aujourd'hui en faveur du rôle majeur des anticorps neutralisants anti-VHC dans la clairance virale et dans la protection contre la réinfection (Fafi-Kremer et al., 2012). Dans une cohorte d'usagers de drogues IV qui avaient spontanément éliminé le VHC une première fois, des anticorps cross-neutralisants (dirigés contre des VHC de génotypes et/ou de sous-types différents) étaient détectables chez 60 % des individus qui parvenaient à éliminer à nouveau le virus après réexposition, suggérant un rôle des anticorps neutralisants dans la prévention contre les réinfections (Osburn et al., 2010). L'induction rapide d'anticorps neutralisants a été corrélée à la clairance virale chez des femmes accidentellement infectées par le même inoculum de VHC provenant d'un lot d'immunoglobulines anti-D contaminé (Pestka et al., 2007). De manière intéressante, le suivi exhaustif d'une cohorte de patients qui avaient spontanément éliminé le VHC lors de la phase chronique de l'infection a également permis d'associer la clairance

virale avec l'apparition d'anticorps neutralisants (Raghuraman et al., 2012). Ces observations suggèrent un rôle important des anticorps neutralisants dans la résolution spontanée de l'infection à la fois lors de la phase aiguë et durant la phase chronique. Certains anticorps neutralisants dirigés contre des épitopes spécifiques sur E1-E2 et capables de reconnaitre des isolats de VHC de différents génotypes ont récemment été mis en évidence. Ils pourraient favoriser la clairance spontanée du virus et éviter la survenue de réinfections par des souches hétérologues chez les patients (Law et al., 2008; Ndongo et al., 2010).

3. Echappement du VHC au système immunitaire

Bien que les différents acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative soient déployés pour faire face à l'infection par le VHC, seulement un tiers des patients réussit à éliminer spontanément le virus. La persistance virale observée chez les autres patients est liée à la fois à des facteurs de l'hôte et à des mécanismes d'échappement immunitaire du virus (Thimme et al., 2012).

3.1. Echappement à l'immunité innée

Mécanismes d'échappement à l'immunité cellulaire intrinsèque

La mise en place de la réponse immunitaire innée anti-VHC dépend en premier lieu de la capacité des hépatocytes à détecter les motifs moléculaires viraux et à déclencher la libération des IFNs. Plusieurs protéines du VHC interfèrent avec ces premières étapes de la réponse immunitaire (Figures 12 A et B). Ainsi, la protéase NS3-NS4A clive les protéines adaptatrices MAVS et TRIF, indispensables à la transduction du signal déclenché par l'activation de RIG-I, PKR et TLR-3 (Horner and Gale, 2013). Il est intéressant d'observer qu'à la différence de la protéine MAVS humaine, les protéines MAVS de certains primates sont naturellement résistantes au clivage par la protéase NS3-NS4A. Une seule mutation ponctuelle sur le site de clivage de MAVS semble suffisante pour expliquer la différence de sensibilité des protéines MAVS humaines et primates à l'action de NS3-NS4A (Patel et al., 2012). La capacité du VHC à cliver la protéine MAVS pourrait donc avoir joué un rôle déterminant dans l'adaptation du virus à l'homme. L'engagement des IFNs de types I et III sur leurs récepteurs membranaires conduit à l'expression des *Interferon-stimulated genes* (ISGs) grâce à la voie de signalisation JAK-STAT et à la formation du complexe de transcription *Interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF-3 ; regroupant STAT-1, STAT-2 et IRF-9). Cette cascade de signalisation est une cible importante des protéines virales (Figure 12). Il a par exemple été observé que la protéine Core interfère avec la voie JAK-STAT en (1)

inhibant l'activation de STAT-1 et en favorisant sa dégradation, (2) en stimulant l'expression de SOCS-3, un inhibiteur de la voie JAK-STAT et (3) en bloquant la fixation du complexe ISGF-3 sur les *IFN-stimulated response elements* présents sur les promoteurs des ISGs (Rehermann, 2009). D'autres protéines du VHC interfèrent directement avec les produits des ISGs. Par exemple, la protéine NS5A inhibe à la fois l'action de la PKR et celle de la 2'-5' OAS (Rehermann, 2009).

Dérégulation des cellules dendritiques

Au cours de l'infection par le VHC, le nombre de cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes (mDCs et pDCs) est diminué dans le compartiment sanguin mais augmenté dans le foie (Lambotin, Baumert, et Barth 2010). Les mécanismes conduisant à l'accumulation hépatique des DCs au cours de l'hépatite C restent imparfaitement compris. Des études *in vitro* ont démontré que la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC inhibe la migration des DCs (Nattermann et al., 2006). Ce résultat suggère que le VHC pourrait directement altérer la capacité qu'ont les DCs de migrer vers les ganglions lymphatiques pour y présenter les antigènes viraux et déclencher la réponse immunitaire adaptative.

Plusieurs études ont également observé une altération de la maturation et de la différenciation des DCs au cours de l'hépatite C chronique. Les DCs provenant de patients chroniquement infectés par le VHC ont une plus faible capacité d'activation des lymphocytes T que les DCs de sujets sains (Lambotin, Baumert, et Barth 2010). Les productions d'IL-12 (par les mDCs) et d'IFN-α (par les pDCs) sont réduites, tandis que la production d'IL-10 est augmentée, ce qui suggère une orientation globale de la réponse immunitaire vers l'immunotolérance, plus favorable à la persistance virale (Figure 13) (Lambotin, Baumert, et Barth 2010).

Dérégulation des cellules NK

De nombreuses études ont mis en évidence une altération de la fréquence, du phénotype et du fonctionnement des cellules NK chez les patients chroniquement infectés par le VHC (Cheent and Khakoo, 2011). Les cellules NK présentent à leur surface un panel de récepteurs activateurs ou inhibiteurs qui régulent leur activation. Les cellules NK provenant de patients chroniquement infectés par le VHC sur-expriment des récepteurs inhibiteurs et produisent des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 ou le TGF-β lorsqu'elles sont placées au contact des hépatocytes, ce qui diminue la cytotoxicité et favorise l'immunotolérance (Figure 13) (Jinushi et al., 2004). De plus, la libération de cytokines immunosuppressives dans le microenvironnement contribue à l'altération fonctionnelle des DCs et à la perte

d'activation des lymphocytes Th1 au profit de lymphocytes Th2 ou Tregs (Jinushi et al., 2004). Il a récemment été suggéré dans un modèle *in vivo* que les cellules NK pourraient jouer un rôle clé dans la régulation des lymphocytes T $CD4^+$ et dans le phénomène d'épuisement des lymphocytes T $CD8^+$ qui caractérise l'infection chronique par le VHC (Waggoner et al., 2012).

3.2. Echappement à l'immunité adaptative

Echappement à l'immunité humorale

L'évolution du VHC en quasi-espèce virale favorise la sélection de variants viraux capables d'échapper continuellement à la reconnaissance par les anticorps de l'hôte (Figure 13) (von Hahn et al., 2007). Des mutations ponctuelles sur les épitopes reconnus par les anticorps et des modifications de la glycosylation ou de la conformation de E1-E2 permettent au VHC de s'adapter à la pression humorale. De plus, l'association étroite entre la particule virale et les lipoprotéines de l'hôte pourrait masquer certains épitopes présents sur les glycoprotéines d'enveloppe. Enfin, la transmission directe du virus de cellule à cellule entre les hépatocytes voisins pourrait altérer sa détection par les anticorps neutralisants de l'hôte (Fafi-Kremer et al., 2010, 2012; Xiao et al., 2014).

Echappement à la reconnaissance par les lymphocytes T

Le taux de mutations élevé du VHC contribue indiscutablement à la sélection de variants viraux non reconnus par les lymphocytes T du patient. Chez le chimpanzé, l'émergence de mutations d'échappement sur les épitopes ciblés par les lymphocytes T $CD8^+$ a été corrélée à la persistance virale (Erickson et al., 2001). De la même manière, il a été suggéré que la sélection précoce de mutations d'échappement aux lymphocytes T favorise la chronicité de l'infection chez les patients (Seifert et al., 2004; Timm et al., 2004). Néanmoins, il est important de noter que ces mutations n'affectent que 50 à 70 % des épitopes viraux reconnus par les lymphocytes T $CD8^+$ lors de l'hépatite C chronique (Cox et al., 2005b; Meuleman et al., 2005). La variabilité génétique du VHC n'est donc pas la seule étiologie expliquant l'incapacité des lymphocytes T à éliminer totalement le virus.

Des facteurs de l'hôte sont impliqués dans la persistance virale. Puisque la reconnaissance des peptides viraux par les lymphocytes T est restreinte par le répertoire HLA de l'hôte, les variations interindividuelles liées au polymorphisme du système HLA permettent d'expliquer au moins en partie le succès ou l'échec de la réponse adaptative contre le VHC. Certains

allèles du système HLA de classes I et II ont ainsi été associés à une plus forte probabilité de clairance virale, tels que les allèles HLA-B27, HLA-B57 et HLA-A3 pour le HLA de classe I et les allèles DRB1*1101 et DQB1*0301 pour le HLA de classe II. A l'inverse, d'autres allèles favoriseraient le passage à la chronicité comme l'allèle HLA-B8 (Fitzmaurice et al., 2011; Hong et al., 2005; Kim et al., 2011; McKiernan et al., 2004).

Epuisement de l'immunité cellulaire et tolérance immunitaire

L'hépatite C chronique s'accompagne de la perte d'une partie de la diversité des épitopes initialement reconnus et surtout d'un dysfonctionnement des lymphocytes T anti-VHC, qualifié d' « épuisement » (Figure 13) (Cox et al., 2005b; Schulze Zur Wiesch et al., 2012). Les lymphocytes T $CD8^+$ anti-VHC des patients chroniquement infectés ont une faible capacité de prolifération, de production d'IFN-γ et de cytotoxicité (Jo et al., 2012; Wedemeyer et al., 2002). Ils expriment à leur surface un panel de récepteurs inhibiteurs impliqués dans l'immunosuppression et la tolérance immunitaire tels que PD-1, 2B4, TIM-3 ou CTLA-4 (Owusu Sekyere et al., 2014; Penna et al., 2007). De la même manière, les lymphocytes T $CD4^+$ surexpriment les récepteurs PD-1 et CTLA-4 au cours de l'hépatite C chronique (Raziorrouh et al., 2011).

Les raisons de ce phénomène d'épuisement des lymphocytes T sont mal comprises. Il pourrait être lié à la persistance de la stimulation antigénique, à l'insuffisance de la stimulation des lymphocytes T $CD8^+$ par les lymphocytes T $CD4^+$, à la présence de cytokines immunosuppressives dans le microenvironnement ou à l'action des lymphocytes Tregs (Thimme et al., 2012). En faveur de cette idée, il a récemment été observé que le blocage de PD-L1/2 (les ligands des récepteurs PD-1), de l'IL-10 ou du TGF-β augmentait la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ anti-VHC *in vitro* et restaurait leur capacité de sécrétion d'IFN-γ et de cytokines pro-inflammatoires (Raziorrouh et al., 2011). L'action immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs (Tregs) est importante à considérer. La proportion de lymphocytes Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ est augmentée chez les patients chroniquement infectés par le VHC par rapport aux patients qui ont éliminé le virus et aux sujets sains (Cabrera et al., 2004; Sugimoto et al., 2003). Les lymphocytes Tregs sont fortement attirés dans le foie lors de l'hépatite C chronique (Ward et al., 2007). Ils inhibent la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ et leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires via un contact direct entre les cellules et via la libération de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF-β (Bolacchi et al., 2006; Rushbrook et al., 2005).

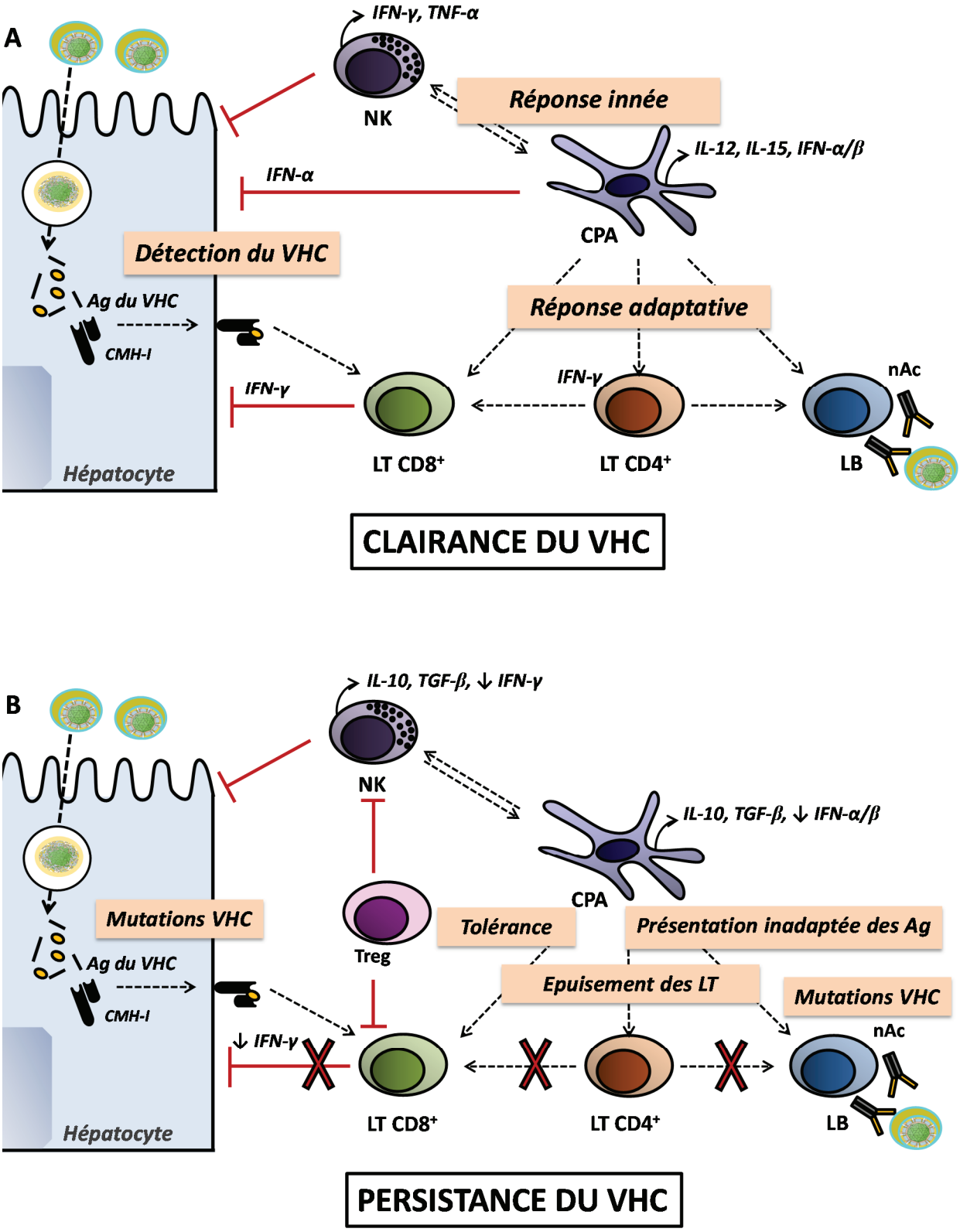


Figure 13 : Réponse immunitaire au cours de l'hépatite C.

(A) *Réponse immunitaire associée à la clairance virale. La détection du virus par la cellule infectée et l'activation des DCs et des cellules NK contribuent à la réponse immunitaire innée. Les DCs et les cellules NK libèrent des cytokines pro-inflammatoires. Les DCs présentent les antigènes viraux aux lymphocytes T et déclenchent la réponse adaptative antivirale. La réponse adaptative cellulaire est*

médiée par la coopération entre les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et permet de détruire les hépatocytes infectés. Les anticorps neutralisants (nAc) sécrétés par les lymphocytes B assurent l'efficacité de la réponse adaptative humorale. ***(B)*** *Réponse immunitaire associée à la persistance virale. La sécrétion de cytokines immunosuppressives par les DCs et les cellules NK et l'afflux de lymphocytes Tregs favorisent l'immunotolérance. Les DCs perdent leur capacité d'activation de lymphocytes T effecteurs. L'activation chronique du système immunitaire, l'immunotolérance et l'insuffisance de stimulation des lymphocytes T conduisent à l'épuisement de la réponse adaptative cellulaire. Les mutations du VHC favorisent l'échappement aux lymphocytes T et aux nAcs. Ag : antigènes ; nAc : anticorps neutralisants ; LT : lymphocytes T.*

De nombreux arguments plaident en faveur d'une dérégulation de la réponse cellulaire adaptative antivirale au cours de l'infection par le VHC, favorisant l'échappement du virus et sa persistance dans l'organisme. Les mécanismes responsables de l'épuisement de l'immunité adaptative cellulaire sont mal compris. Néanmoins, la mise en place d'une tolérance immunitaire vis-à-vis du VHC apparait comme un point clé de la persistance virale. La compréhension des mécanismes responsables de cette tolérance immunitaire est un enjeu majeur pour le développement de nouvelles thérapies et de vaccins prophylactiques ou thérapeutiques efficaces contre le VHC.

Partie II : indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO)

I. Le catabolisme du tryptophane

1. Le tryptophane

Le tryptophane (Try) est un acide aminé aromatique formé d'un carbone central porteur des fonctions carboxyle et amine et d'un radical comprenant un noyau indole fortement hydrophobe (Figure 14). Les animaux supérieurs et l'homme sont incapables de synthétiser ce noyau indole. Le Try fait donc partie des 9 acides aminés dits « essentiels » qui doivent être apportés par l'alimentation. Il est aussi le plus rare des 20 acides aminés puisqu'il ne représente que 1 à 1,5 % des acides aminés constituant les protéines cellulaires (Le Floc'h et al., 2011), à l'exception notable des protéines de la phase aiguë de l'inflammation qui en contiennent des quantités plus élevées (Reeds et al., 1994). En dépit de la faible proportion de Try dans les protéines de l'organisme, cet acide aminé et ses dérivés jouent un rôle biologique considérable. Ils sont en particulier impliqués dans la régulation de l'inflammation et de l'immunité, le fonctionnement du système nerveux central, la régulation de l'humeur ou encore le maintien de la pression artérielle (Le Floc'h et al., 2011; Kolodziej et al., 2011; Takikawa, 2005).

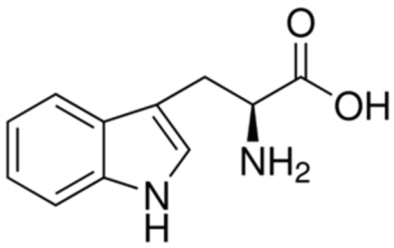


Figure 14 : Représentation chimique du tryptophane.

Le Try est le précurseur métabolique de la sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT), un neurotransmetteur indispensable à la régulation de l'humeur, de l'appétit et des mécanismes hémodynamiques (Berger et al., 2009). La sérotonine est elle-même le précurseur de la mélatonine (N-acétyl-5-methoxytryptamine), une hormone clé de la régulation des rythmes chrono-biologiques (Brzezinski, 1997). La dérégulation du métabolisme intracérébral du Try pourrait jouer un rôle majeur dans la genèse de certaines maladies neurologiques ou psychiatriques (Campbell et al., 2014a).

Outre son implication dans la biosynthèse des protéines et de la sérotonine, le Try peut connaître un troisième destin dans l'organisme : la dégradation. Environ 95 % du Try de l'organisme est ainsi catabolisé, alors que seulement 1 % est converti en sérotonine (Takikawa, 2005). La voie de dégradation du Try est un processus métabolique complexe, conduisant à la formation d'intermédiaires métaboliques biologiquement actifs appelés collectivement « les kynurénines ». Cette voie dite des « kynurénines » aboutit *in fine* à la synthèse de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) (Beadle et al., 1947). Elle est la seule source endogène de NAD^+ dans l'organisme. Au cours des dernières décennies, la voie des kynurénines a été impliquée dans des processus physiologiques ou pathologiques majeurs tels que la régulation de la réponse immunitaire et de l'inflammation, la grossesse ou les mécanismes d'oxydoréduction (Le Floc'h et al., 2011; Kolodziej et al., 2011; Takikawa, 2005).

2. La voie des kynurénines

La première étape et l'étape limitante de la voie des kynurénines est le clivage oxydatif du noyau pyrrole du L-Try par une dioxygénase (Figure 15). Chez l'homme, trois dioxygénases peuvent catalyser cette première étape : la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO ; EC 1.13.11.11) et les indoléamine-2,3-dioxygénases 1 et 2 (IDO-1 et IDO-2 ; EC 1.13.11.52) (Ball et al., 2014). Le produit de la réaction est la **N-formylkynurénine**, un composé instable qui tend spontanément à se dégrader. Au cours d'une seconde étape, la N-formylkynurénine est convertie en un composé plus stable, la **L-Kynurénine** (L-Kyn), soit spontanément en milieu acide, soit grâce à l'*arylformamidase* (EC 3.5.1.9). La L-Kyn est ensuite hydroxylée en un aminophénol, la **3-hydroxykynurénine** (3-HK), puis clivée en **acide 3-hydroxyanthranilique** (3-HAA) grâce à l'action de deux enzymes successives, la *kynurénine 3-monooxygénase* (EC 1.14.13.9) et la *kynuréninase* (EC 3.7.1.3). La *kynuréninase* peut également convertir directement la L-Kyn en 3-HAA en formant un autre intermédiaire métabolique, **l'acide anthranilique**. Alternativement, la L-Kyn et la 3-HK peuvent servir de substrat à la *Kynurénine-oxoglutarate transaminase* (EC 2.6.1.7) pour former respectivement **l'acide kynurénique** et **l'acide xanthurénique**. Grâce à l'action de la *3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygénase* (EC 1.13.11.6), le 3-HAA est converti en un intermédiaire instable **l'acide 2-amino-3-carboxymuconique-6-semialdéhyde** qui aboutit spontanément à la synthèse d'**acide quinolinique** ou qui sert de substrat à l'*aminocarboxymuconate-semialdéhyde décarboxylase* (EC 4.1.1.45) pour former l'**acide picolinique**. La dernière étape de la voie des kynurénines, catalysée par la *Nicotinate-nucléotide diphosphorylase* (EC 2.4.2.19), aboutit à la synthèse du NAD^+. La dégradation complète de l'acide 2-amino-3-carboxymuconique-6-semialdéhyde peut également entrainer la formation de CO_2 via la glutaryl-coenzyme A et le cycle de Krebs.

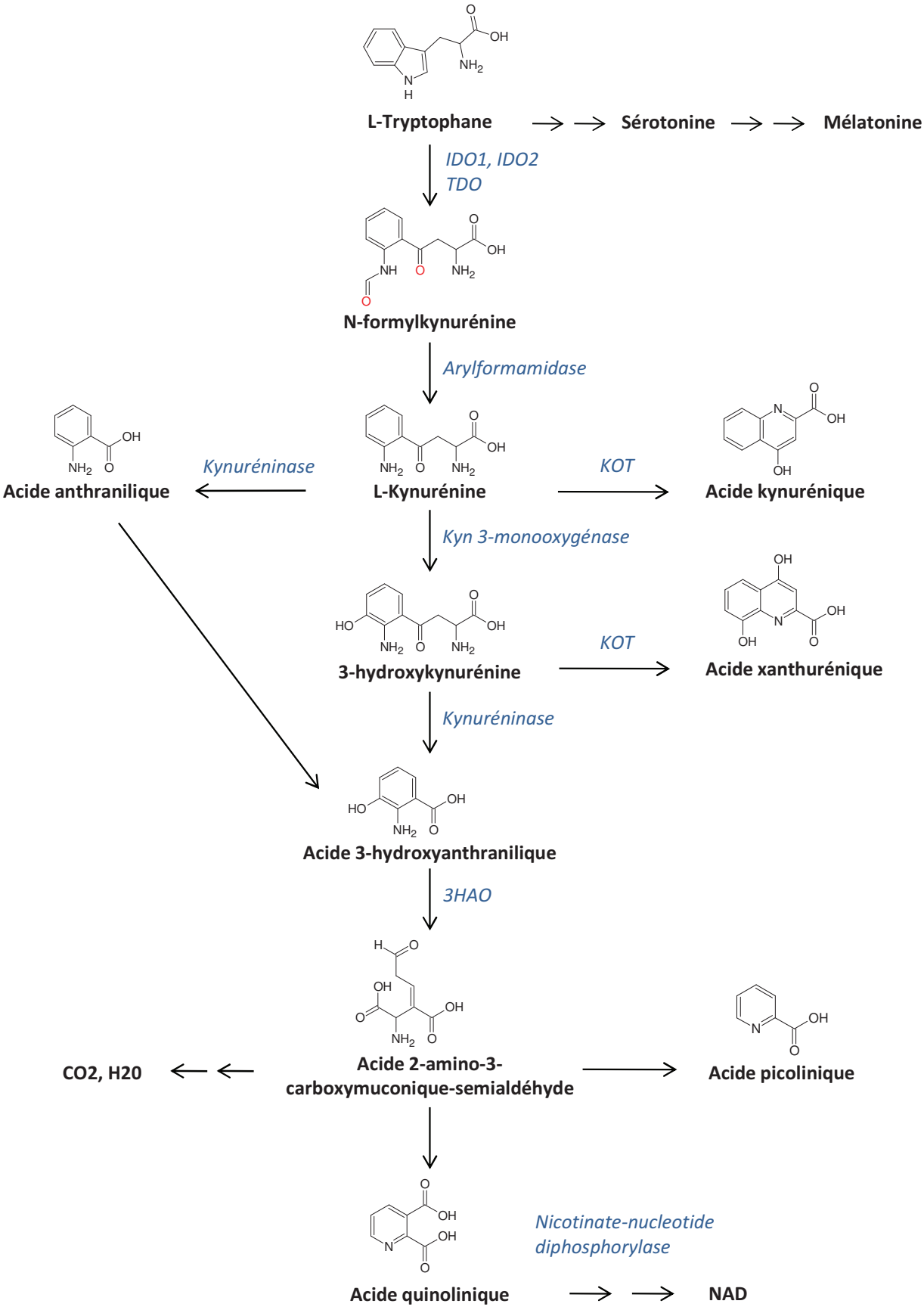

L-Tryptophane
Sérotonine
Mélatonine
IDO1, IDO2
TDO
N-formylkynurénine
Arylformamidase
Acide anthranilique
Kynuréninase
L-Kynurénine
KOT
Acide kynurénique
Kyn 3-monooxygénase
3-hydroxykynurénine
KOT
Acide xanthurénique
Kynuréninase
Acide 3-hydroxyanthranilique
3HAO
CO2, H20
Acide 2-amino-3-carboxymuconique-semialdéhyde
Acide picolinique
Nicotinate-nucleotide diphosphorylase
Acide quinolinique
NAD

Figure 15 : La voie des kynurénines. *Cascade réactionnelle de la dégradation du tryptophane. L'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO) clive le noyau pyrole du L-Try au cours d'une réaction de dioxygénation (en rouge : atomes d'oxygènes apportés lors de la réaction). TDO : tryptophane-2,3-dioxygénase; KOT : Kynurénine-oxoglutarate transaminase ; 3 HAO : 3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygénase ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide. La représentation des formules biochimiques a été réalisée en utilisant le logiciel ChemSketch.*

3. Trois dioxygénases pour une même réaction

La tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO), l'indoléamine-2,3-dioxygénase 1 (IDO-1) et son homologue l'IDO-2 catalysent la même étape de dioxygénation du tryptophane. Ces enzymes présentent cependant de nombreuses différences dans leur structure, leurs modalités d'expression et leur spécificité de substrats qui les placent dans des niches biologiques bien distinctes. Nous présenterons brièvement les principales caractéristiques de ces enzymes avant d'étudier plus en détail l'une d'entre elles : IDO-1.

3.1. TDO

Historiquement, TDO fut découverte dès 1936 dans le foie de mammifères (Kotake 1936). TDO est un homotétramère d'environ 134 kDa dont le site actif contient une molécule d'hème permettant de fixer le dioxygène (O_2) et de l'incorporer au L-Try (Zhang et al., 2007). Sa spécificité de substrats est très étroite, limitée avant tout au L-Try et à quelques analogues du tryptophane substitués en position 5 ou 6 (Forouhar et al., 2007). TDO est une enzyme très conservée au cours de l'évolution, présente à la fois chez les bactéries, les archées et les eucaryotes (Ball et al., 2014). A la différence de certaines espèces qui possèdent plusieurs gènes homologues de TDO, l'homme ne contient qu'un seul gène codant pour TDO, porté par le chromosome 4 (Ball et al., 2014). Chez l'homme et chez les organismes supérieurs, TDO est exprimée de façon constitutive dans le foie où elle assure le catabolisme du tryptophane d'origine digestive. TDO est ainsi la garante de l'homéostasie du tryptophane dans l'organisme (Le Floc'h et al., 2011).

3.2. IDO-1 et IDO-2

IDO-1 a été mise en évidence pour la première fois en 1967 par l'équipe de Hayaishi *et al.* dans l'intestin de lapin (Yamamoto 1967). Comme TDO, IDO-1 est une hétéroprotéine contenant une molécule d'hème nécessaire à son activité enzymatique (Forouhar et al.,

2007). La diversité des séquences génétiques entre TDO et IDO-1 suggère que les 2 isoenzymes ne sont pas homologues mais qu'elles ont évolué séparément pour catalyser la même réaction dans un modèle de convergence évolutive fonctionnelle (Ball et al., 2014). IDO-1 est retrouvée avant tout chez les vertébrés supérieurs, ce qui suggère que cette enzyme est apparue plus récemment que TDO au cours de l'évolution. Chez l'homme et les organismes supérieurs, IDO-1 est exprimée dans de nombreux tissus et organes, comme le système nerveux central, l'intestin, le tractus respiratoire, la rate, le placenta, le rein et surtout les cellules présentatrices d'antigène du système immunitaire (Taylor and Feng, 1991). En contexte physiologique, l'expression de IDO-1 est faible. A l'inverse, l'expression de IDO-1 est induite au cours de la réaction inflammatoire qui accompagne de nombreuses situations pathologiques comme les infections, les allergies ou les cancers. IDO-1 possède une spécificité de substrats plus large que TDO vis-à-vis de nombreux dérivés et d'analogues du tryptophane.

IDO-2 est une enzyme homologue de IDO-1 dont la découverte est récente (Ball et al., 2007; Metz et al., 2007; Yuasa et al., 2007). Les deux enzymes IDO-1 et IDO-2 partagent une homologie de séquence en acides aminés d'environ 43 % (Austin and Rendina, 2014; Ball et al., 2007). Chez l'homme, les gènes codant pour IDO-1 et IDO-2 sont adjacents sur le chromosome 8 et présentent une organisation génomique similaire, suggérant que *IDO-1* et *IDO-2* sont issus de la duplication d'un même gène au cours de l'évolution. La présence de IDO-2 chez les invertébrés inférieurs suggère que son origine est plus ancienne que IDO-1 (IDO-2 a été initialement nommée « proto-IDO » (Yuasa et al., 2007)). La duplication génétique qui a conduit aux deux paralogues IDO-1 et IDO-2 serait survenue avant l'apparition des tétrapodes (environ 300 millions d'années) (Ball et al., 2007; Yuasa et al., 2007).

Les modalités d'expression et le rôle joué par IDO-2 chez l'homme sont mal compris. D'une part, il a été suggéré que 50 % des individus européens ou asiatiques et 25 % des sujets africains ne possèdent pas d'allèle fonctionnel codant pour IDO-2 (Metz et al., 2007). D'autre part, la spécificité de substrats entre IDO-1 et IDO-2 est différente. En particulier, l'affinité de IDO-2 pour le L-Try est beaucoup plus faible que celle de IDO-1, suggérant que les 2 enzymes ne sont pas redondantes chez l'homme mais qu'elles possèdent des rôles biologiques bien distincts (Pantouris et al., 2014). Compte-tenu de la faible activité catalytique de IDO-2 sur le L-Try, il a été suggéré par certains auteurs que le rôle de IDO-2 chez les vertébrés pourrait même être indépendant de son activité enzymatique (Pantouris et al., 2014).

II. L'indoléamine-2,3-dioxygénase

Compte-tenu de l'implication de IDO-1 dans la régulation de la réponse inflammatoire et dans de nombreux mécanismes physiopathologiques, ses caractéristiques méritent d'être mentionnées plus en détail. Puisque la découverte de IDO-2 est récente, de nombreuses études ont évalué l'expression et l'action globales de IDO sans distinction entre les isoformes IDO-1 et IDO-2. Bien que nous concentrerons notre attention avant tout sur IDO-1, nous emploierons également régulièrement le terme de global de « IDO » pour nous conformer aux données de la littérature. Lorsque l'information sera pertinente ou connue, nous spécifierons la nature de l'isoforme impliquée.

1. Le gène *IDO-1* et son expression

Le gène codant pour IDO-1 est situé en position 8p12-p11 sur le bras court du chromosome 8 (Burkin et al., 1993). Il est constitué de 10 exons.

L'étude du promoteur du gène *IDO-1* (également appelé *INDO* ou *IDO*) a permis de mieux comprendre la régulation de l'expression de IDO-1 chez l'homme. Le promoteur de *IDO-1* contient plusieurs séquences génétiques stimulées par les interférons : des *interferon-stimulated response elements* (ISRE) et des *gamma-interferon activation sequences* (GAS). En tout, 2 ISRE et 3 GAS régulent l'expression de IDO-1 (Figure 16) (Konan and Taylor, 1996; Robinson et al., 2003). La présence des deux séquences ISRE et la coopération entre les séquences ISRE et GAS sont indispensables à l'induction maximale de *IDO-1* lors de la stimulation par l'IFN-γ (Chon et al., 1996; Konan and Taylor, 1996). Au cours de la stimulation par l'IFN-γ, l'expression de IDO-1 est médiée par la coopération entre les facteurs de transcription IRF-1 et phospho-STAT-1 qui se fixent respectivement sur les séquences ISRE et GAS du promoteur (Figure 16) (Chon et al., 1996).

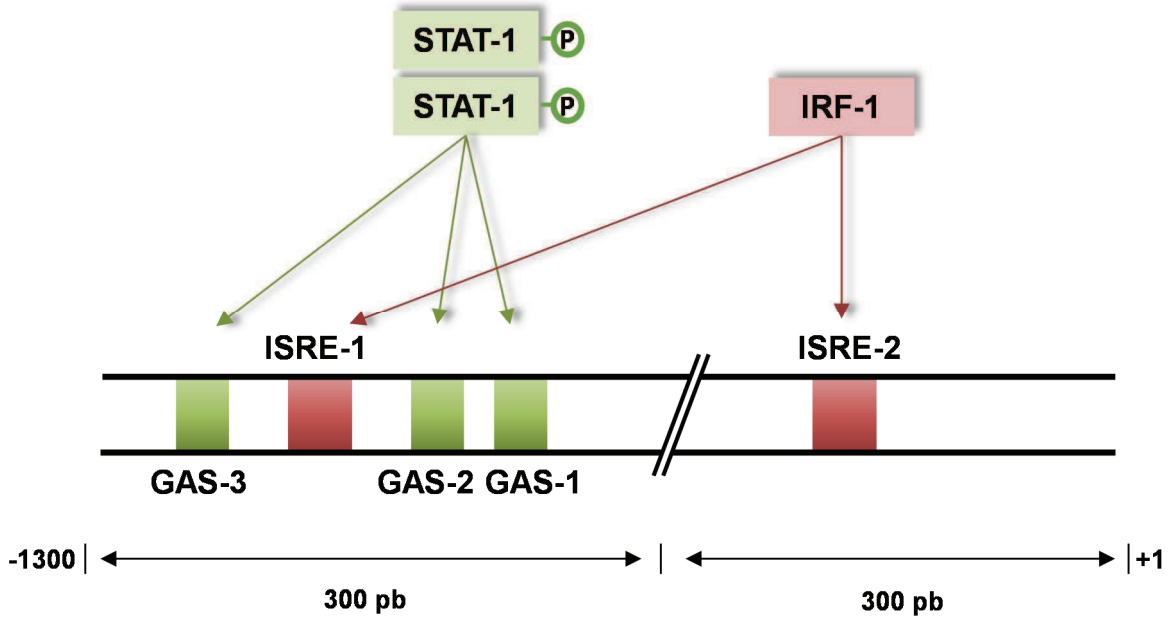


***Figure 16 : Régions régulatrices sur le promoteur du gène* IDO-1.**
Plusieurs sites d'activation par les IFNs sont présents sur le promoteur de IDO-1*. Deux séquences GAS sont intercalées entre 2 séquences ISRE. Une 3ème séquence GAS est située plus en amont sur le promoteur. Lors d'une stimulation par l'IFN-γ, les facteurs de transcription IRF-1 et STAT-1 se fixent respectivement sur les sites ISRE et GAS pour stimuler l'expression de IDO-1. Adapté de (Robinson et al., 2003).*

En plus des séquences ISRE et GAS, des séquences consensus permettant la fixation des facteurs de transcription NF-κB, AP-1 et NF-IL6 ont été décrites sur le promoteur de *IDO-1* (Fujigaki et al., 2006a). Ces éléments génétiques pourraient permettre une stimulation de *IDO-1* indépendante de l'IFN-γ, médiée notamment par les lipopolysaccharides (LPS) bactériens ou par certaines cytokines pro-inflammatoires (voir paragraphe spécifique).

2. La protéine IDO-1 et son activité enzymatique

IDO-1 est une hétéroprotéine de 403 acides aminés et d'environ 45 kDa (Dai and Gupta, 1990; Tone et al., 1990). Elle est formée d'un seul monomère et contient une molécule d'hème indispensable à son action catalytique. IDO-1 peut être subdivisée en un domaine large et un domaine court. Le domaine large abrite une poche hydrophobe qui contient l'hème et où se fixe le substrat (Figure 17A). La détermination de la structure cristallographique de IDO-1 chez l'homme a constitué une étape importante dans la compréhension du fonctionnement de cette enzyme (Sugimoto et al., 2006). En particulier, il a été observé que le site actif était dépourvu d'acide aminé polaire, à l'exception de la

présence d'un résidu sérine (Ser167). Cette conformation apolaire permet d'accueillir le noyau indole hautement hydrophobe du tryptophane. Néanmoins, l'absence d'acide aminé polaire (et notamment d'histidine distale, impliquée dans la fixation du dioxygène chez d'autres hémoprotéines) a heurté les conceptions classiques du fonctionnement des hémoprotéines et a contredit les mécanismes catalytiques initialement suggérés pour IDO-1 (Capece et al., 2012; Sugimoto et al., 2006). Schématiquement, la face proximale de l'hème est fixée sur la structure protéique grâce à une histidine proximale (His346), tandis que la fixation de l'O_2, le contact avec le substrat et la réaction catalytique se déroulent sur la face distale de l'hème (Figure 17B).

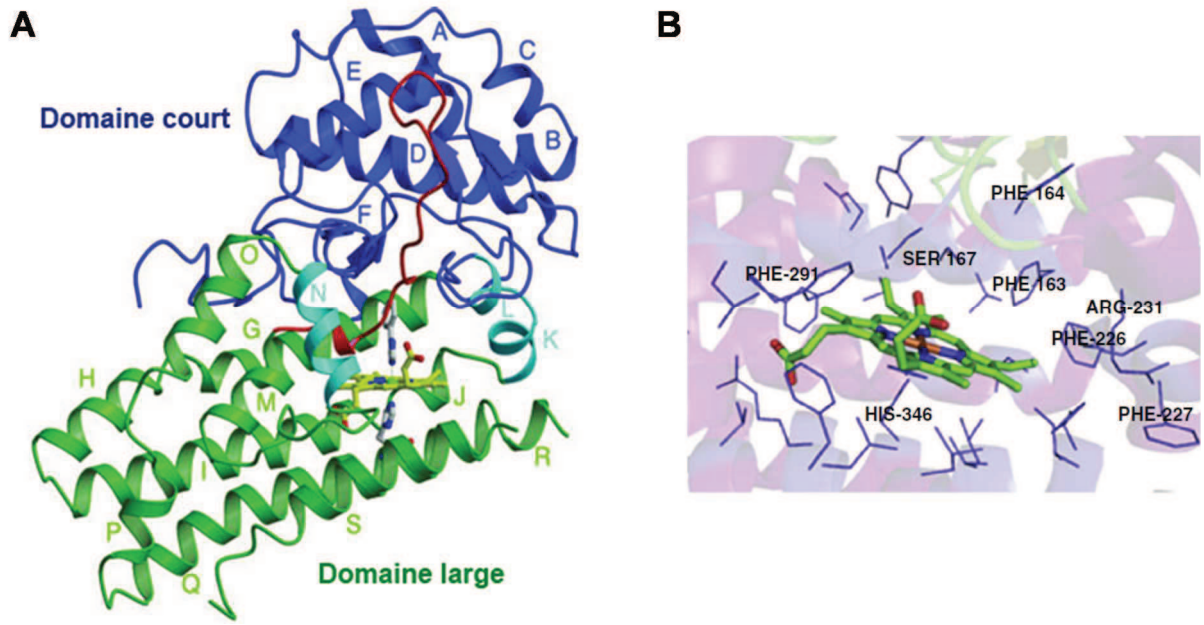


Figure 17 : Structure de la protéine IDO-1.

(A) *Représentation générale de la protéine. IDO-1 est constituée de 2 domaines (domaine large en vert ; domaine court en bleu) reliés par une structure en boucle (rouge) et par des hélices α (cyan). Les hélices α du domaine large créent une cavité où se loge l'hème (jaune). Le domaine court et la structure en boucle recouvrent le haut de la cavité abritant l'hème. Les hélices α sont nommées dans l'ordre de leur apparition sur la structure primaire. La structure a été établie en utilisant la protéine IDO-1 recombinante humaine complexée avec le ligand 4-phenylimidazole (blanc).* ***(B)*** *Représentation moléculaire du site actif de IDO-1. L'hème (vert) est fixé à l'Histidine proximale (His346) par sa face proximale. La face dorsale de l'hème est située dans une poche hydrophobe qui accueille le substrat. D'après (Austin and Rendina, 2014; Sugimoto et al., 2006).*

IDO-1 est capable de fixer les deux énantiomères lévogyre et dextrogyre du tryptophane (L-Try et D-Try). Il utilise également comme substrats de nombreux analogues ou dérivés du

tryptophane tels que le 5-hydroxytryptophane, le 5-méthyltryptophane, la tryptamine et la sérotonine (Pantouris et al., 2014; Sono et al., 1996).

3. Expression de IDO

3.1. Contextes d'expression de IDO

L'expression de IDO a été observée dans de nombreux tissus et organes chez l'homme (Taylor and Feng, 1991). Les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules microgliales sont parmi les principales cellules productrices de IDO et sont capables d'exprimer IDO à des niveaux élevés (Mellor and Munn, 2004). En plus des CPAs, IDO peut être exprimée dans des contextes physiologiques ou pathologiques par des cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastiques et même par des cellules tumorales (Godin-Ethier et al., 2011; Munn and Mellor, 2013).

L'expression de IDO est inductible sous l'action de divers stimuli au cours de la réaction inflammatoire (Le Floc'h et al., 2011; Munn and Mellor, 2013). Les IFNs et les cytokines pro-inflammatoires sont alors les principaux stimuli conduisant à l'expression de IDO. En retour, IDO participe à l'immunorégulation visant à éviter le développement d'une réponse lymphocytaire T excessive et délétère pour l'individu. IDO contribue donc au rétrocontrôle négatif (*counter-regulation*) de la réponse inflammatoire (Mellor and Munn, 2004). Parallèlement, ce rôle immunorégulateur de IDO est mis à profit par le système immunitaire adaptatif dans le développement de la tolérance périphérique vis-à-vis des nouveaux antigènes rencontrés. Dans ce contexte, certaines cellules clés de la tolérance immunitaire telles que les lymphocytes Tregs et certaines cytokines immunosuppressives participent à l'activation de IDO.

3.2. Stimulation de IDO par l'IFN-γ

L'IFN-γ (IFN de type II) est sécrété par les lymphocytes T et les cellules NK et exerce une activité antivirale, immunorégulatrice et anti-tumorale (Boehm et al., 1997). L'IFN-γ est généralement considéré comme le principal activateur de IDO. Sous l'action de l'IFN-γ, de nombreuses cellules hématopoïétiques ou non hématopoïétiques expriment IDO (Hassanain et al., 1993; Konan and Taylor, 1996; Mellor and Munn, 2004; Werner-Felmayer et al., 1989). Chez la souris, la délétion du gène codant pour le récepteur de l'IFN-γ (IFN-γR) abolit presque entièrement l'expression de IDO (O'Connor et al., 2009a).
Les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation de IDO par l'IFN-γ sont schématisés

dans la Figure 18. Au cours d'une première étape, la fixation de l'IFN-γ sur son récepteur active les facteurs de transcription STAT-1 et NF-κB qui sont transloqués dans le noyau et stimulent l'expression de IRF-1 (Pine, 1997). Lors d'une seconde étape, IRF-1 et phospho-STAT-1 se fixent respectivement sur les séquences ISRE et GAS du promoteur de *IDO-1* et induisent sa transcription (Chon et al., 1996).

3.3. Stimuli pro-inflammatoires et motifs microbiens

En plus de l'IFN-γ, l'expression de IDO peut être activée par d'autres cytokines pro-inflammatoires comme les IFNs de type I (IFN-α et -β) ou l'association de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-1β dans certains types cellulaires (Fujigaki et al., 2006a; Hassanain et al., 1993; Jansen and Reinhard, 1999; Robinson et al., 2003; Werner-Felmayer et al., 1989). La reconnaissance de motifs microbiens par les récepteurs *Toll-like* (TLRs) peut également activer l'expression de IDO. Ainsi, la fixation du LPS bactérien (Fujigaki et al., 2006a, 2001; Wang et al., 2010a), des ARN double-brins viraux (Suh et al., 2007) et des motifs CpG non méthylés de l'ADN (Fallarino et al., 2009) sur les TLR-4, TLR-3 et TLR-9 a été impliquée dans l'activation de IDO *in vitro* et/ou *in vivo*.

Plusieurs mécanismes moléculaires permettent d'expliquer l'action de ces composés. D'une part, le TNF-α et l'IL-1β augmentent l'expression des récepteurs de l'IFN-γ (IFN-γR) à la surface des monocytes et des cellules épithéliales, ce qui favorise la fixation de l'IFN-γ sur son récepteur et l'activation de IDO en aval (Figure 18) (Krakauer and Oppenheim, 1993; Shirey et al., 2006a). D'autre part, le TNF-α, l'IL-1β et le LPS pourraient agir en synergie avec l'IFN-γ pour stimuler la transcription de *IDO-1* en activant les facteurs de transcription NF-κB, STAT-1 et IRF-1 (Campbell et al., 2014a; Ohmori et al., 1997; Robinson et al., 2003, 2006). Enfin, en se fixant au TLR-4, le LPS stimule l'expression de IDO indépendamment de la voie de l'IFN-γ dans les monocytes et les cellules microgliales via l'activation de NF-κB et la voie des MAPK (Fujigaki et al., 2006a, 2001; Wang et al., 2010a) (Figure 18). Chez les souris *knock-out* pour le gène de l'IFN-γ, l'activation de IDO médiée par le LPS est conservée, ce qui confirme l'existence d'une voie d'activation de IDO par le LPS indépendante de l'IFN-γ *in vivo* (Fujigaki et al., 2001).

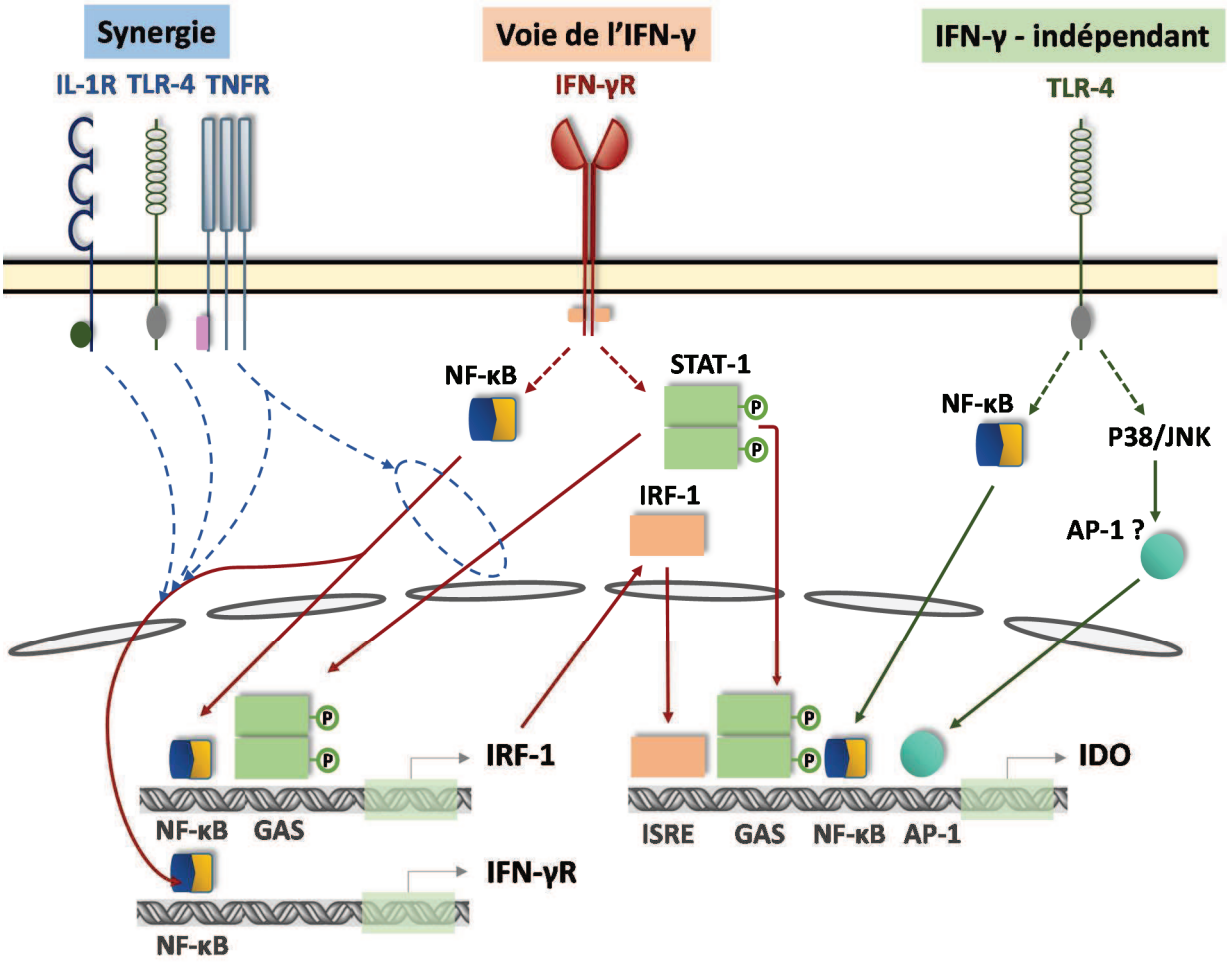


Figure 18 : Voies d'activation de IDO.

Milieu : *Induction de IDO dépendante de l'IFN-γ. La fixation de l'IFN-γ sur son récepteur active les facteurs de transcription STAT-1 et NF-κB qui stimulent la transcription de IRF-1. En association avec STAT-1, IRF-1 stimule l'expression de IDO.* ***Gauche :*** *Induction synergique de IDO. En se fixant sur les récepteurs IL-1R, TLR-4 et TNFR, l'IL-1β, le LPS et le TNF-α augmentent la transcription de l'IFN-γR via l'activation de NF-κB (flèches en pointillés). Le TNF-α agit en synergie avec la voie de l'IFN-γ pour augmenter la transcription de IRF-1 (rond pointillé).* ***Droite :*** *Induction de IDO indépendante de l'IFN-γ. La stimulation du TLR-4 par le LPS stimule la transcription de IDO par un mécanisme nécessitant NF-κB et p38 /JNK, indépendamment de l'IFN-γ. IRF-1 et STAT-1 se fixent respectivement sur les séquences ISRE et GAS du promoteur de IDO. NF-κB et AP-1 se fixent sur des séquences spécifiques du promoteur de IDO. TNFR : récepteur du TNF. D'après (Campbell et al., 2014a).*

Il est important de préciser que la stimulation de IDO par les stimuli pro-inflammatoires est variable suivant le type de cellule (Mellor et Munn, 2004). Ainsi, le LPS stimule l'expression de IDO dans les monocytes/macrophages ou les cellules microgliales (Fujigaki et al., 2006a; Wang et al., 2010a), mais n'influence pas l'expression de IDO dans d'autres modèles cellulaires telles que les cellules hépatiques SK-HEP-1, les fibroblastes MRC9, ou les cellules de neuroblastome SK-N-SH (Fujigaki et al., 2006a).

3.4. Stimuli immunosuppresseurs et tolérogènes

En plus de l'IFN-γ et de certains stimuli inflammatoires, l'expression de IDO peut être médiée par des molécules impliquées dans la tolérance immunitaire et l'immunosuppression.

Engagement de co-récepteurs inhibiteurs

L'interaction entre les cellules dendritiques (DCs) et les lymphocytes T implique un panel de co-récepteurs activateurs ou inhibiteurs qui vont orienter la réponse cellulaire T vers une immunité effectrice ou vers la tolérance immunitaire (Steinman, 2012). En particulier, l'engagement des co-récepteurs CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*) présents à la surface des lymphocytes T sur les co-récepteurs CD80/CD86 (B7-1 et 2) présents à la surface des DCs inhibe la réponse lymphocytaire T vis-à-vis de l'antigène rencontré et contribue à la tolérance immunitaire périphérique (Teft et al., 2006). L'engagement de CTLA-4 sur les co-récepteurs des DCs stimule l'expression de IDO dans certains sous-types de DCs, dont les pDCs, par un mécanisme de *reverse-signalling* (Fallarino et al., 2003; Mellor et al., 2004; Munn et al., 2004a). L'activation de IDO dans les pDCs est alors médiée par la voie non canonique (alterne) de NF-κB impliquant *l'inhibitor of NF-κB kinase-α* (IKK-α) et la formation de dimères p52-REL-B (Figure 19) (Puccetti and Grohmann, 2007).

De la même manière, l'engagement du co-récepteur lymphocytaire GITR (*glucocorticoïd-induced TNF-related protein*) sur le co-récepteur GITR-L présent à la surface des pDCs induit l'expression de IDO dans les pDCs via la voie non-canonique de NF-κB (Grohmann et al., 2007). De manière intéressante, l'administration de glucocorticoïdes *in vivo* active IDO en induisant l'expression de GITR et GITR-L à la surface des lymphocytes T $CD4^+$ et des pDCs (Grohmann et al., 2007). Ce mécanisme pourrait en partie expliquer l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes.

Il est intéressant de noter que les co-récepteurs CTLA-4 et GITR sont fortement exprimés à la surface des lymphocytes Tregs. Les lymphocytes Tregs pourraient être de puissants inducteurs de IDO lors de leur rencontre avec les DCs (Figure 19) (Grohmann et al., 2007; Teft et al., 2006)(Puccetti and Grohmann, 2007; Teft et al., 2006). Puisque les lymphocytes Tregs sont eux-mêmes favorisés par l'activation de IDO (voir ci-dessous), il existe un véritable *cross-talk* entre les lymphocytes Tregs et les DCs pour promouvoir la tolérance périphérique via l'expression de IDO (Puccetti and Grohmann, 2007).

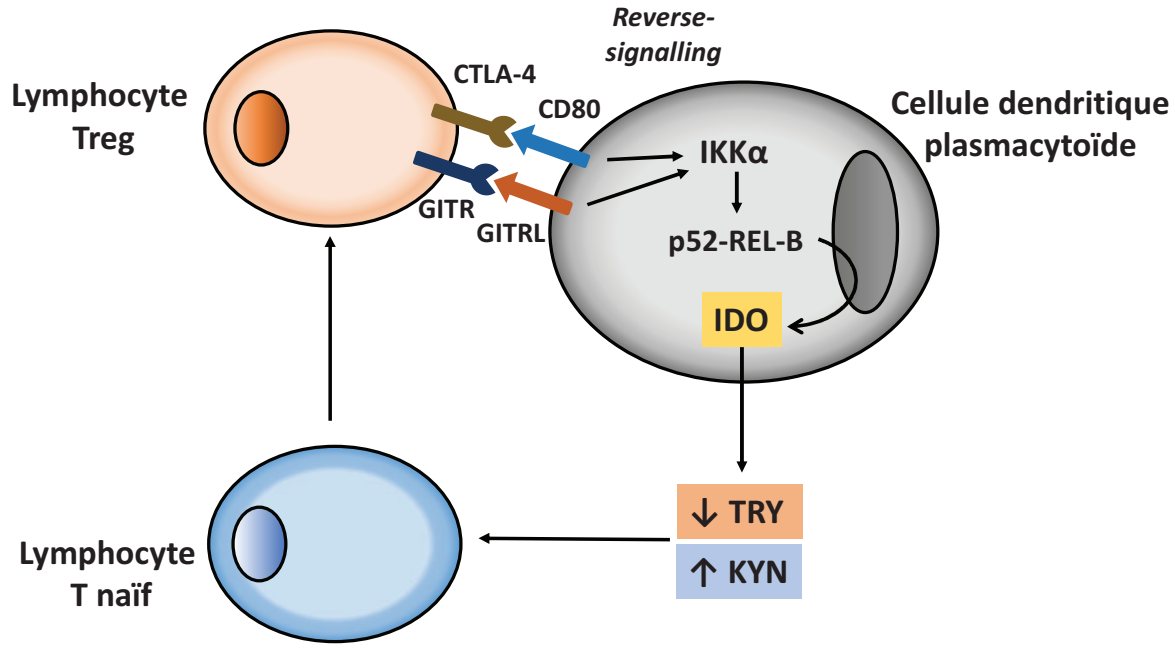


Figure 19 : Expression de IDO dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes après contact avec les lymphocytes Tregs. *L'engagement des co-récepteurs CTLA-4 ou GITR portés par les lymphocytes Tregs sur les co-récepteurs CD80 et GITRL des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) conduit à l'activation de la voie non-canonique de NF-κB (reverse signal) dans les pDCs et à l'expression de IDO. Via son action métabolique, IDO favorise en retour la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Tregs. D'après (Puccetti and Grohmann, 2007).*

Cytokines anti-inflammatoires

L'impact des cytokines anti-inflammatoires sur l'expression de IDO est discuté et semble dépendre du type de cellule considérée et du contexte d'induction de IDO. Ainsi, l'IL-10 diminuait de manière dose-dépendante l'expression de IDO induite par le LPS dans des DCs murines (Jung et al., 2009) mais augmentait l'expression de IDO induite par l'IFN-γ dans ces mêmes cellules (Yanagawa et al., 2009). De la même manière, l'IL-4 inhibait l'induction de IDO médiée par l'IFN-γ dans les monocytes (Musso et al., 1994) et les fibroblastes (Chaves et al., 2001) mais activait IDO dans des cellules microgliales murines (Yadav et al., 2007).

Stimulation par le TGF-β

Le rôle du TGF-β sur l'expression de IDO a été clairement établi. Le TGF-β active l'expression de IDO dans certaines sous-populations de DCs telles que les DCs $CD8^+$ murines et les oriente vers un phénotype tolérogène. En retour, les DCs sécrètent du TGF-β dans le microenvironnement, ce qui maintient un niveau élevé d'expression de IDO par stimulation

autocrine et contribue à instaurer une tolérance immunitaire durable. La voie PI3K/Akt et la voie non-canonique de NF-κB ont été impliquées dans l'expression de IDO par ces DCs murines stimulées par le TGF-β (Belladonna et al., 2008).

Etonnamment, il a récemment été démontré que IDO agit en protéine de signalisation cellulaire dans les pDCs murines, indépendamment de son activité enzymatique (Pallotta et al., 2011). IDO possède des motifs ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)* sur lesquels peuvent se fixer des phosphatases SHP-1/SHP-2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatases*). Sous l'action du TGF-β, l'activation du complexe IDO-SHP contribue à diriger les pDCs murines vers un phénotype tolérogène (Pallotta et al., 2011). Ainsi, le TGF-β apparait comme une cytokine clé de l'activation de IDO. En se stimulant réciproquement, IDO et le TGF-β contribuent à maintenir certaines sous-populations de DCs dans un phénotype tolérogène et favorisent la tolérance immunitaire périphérique (Belladonna et al., 2009; Fallarino et al., 2012).

3.5. Activateurs non-immuns

Plusieurs molécules solubles non impliquées dans la réponse immunitaire stimulent l'expression de IDO. En particulier, certaines hormones comme la gonadotrophine chorionique humaine (Ueno et al., 2007) et les œstrogènes (Zhu et al., 2007) activent l'expression de IDO dans les DCs *in vitro* et/ou *in vivo*. L'immunorégulation exercée par IDO via ces hormones pourrait expliquer la rémission de certaines pathologies auto-immunes comme le diabète ou la sclérose en plaque au cours de la grossesse (Ueno et al., 2007; Zhu et al., 2007).

4. Inhibiteurs pharmacologiques de IDO

Compte tenu de son rôle immunorégulateur dans de multiples processus pathologiques (voir ci-dessous), la développement d'inhibiteurs de IDO a récemment été classé comme prioritaire par le *National Institutes of Health (NIH) Immune Response Modifier Pathway Prioritization Working Group* (Austin and Rendina, 2014; http://www.deainfo.nci.nih.gov). Les inhibiteurs les plus fréquemment utilisés expérimentalement *in vitro* et *in vivo* sont les deux énantiomères 1-méthyl-D-tryptophane (1-D-MT) et 1-méthyl-L-tryptophane (1-L-MT). Ils agissent principalement par inhibition compétitive pour la fixation du tryptophane sur le site catalytique de IDO-1 et/ou de IDO-2, bien que des mécanismes additionnels aient été suggérés comme l'inhibition du transport du tryptophane à travers les membranes cellulaires (Hou et al., 2007; Kudo and Boyd, 2001). Des essais précliniques chez l'animal ont

montré que le 1-MT, seul ou en association avec des chimiothérapies anti-tumorales avait un effet bénéfique sur la progression des cancers en bloquant IDO (Friberg et al., 2002; Muller et al., 2005; Uyttenhove et al., 2003). A ce jour, plusieurs essais cliniques de phases I et II ont été entrepris pour évaluer le potentiel anti-tumoral du 1-MT chez l'homme (NCT00567931, NCT01191216, NCT01792050, NCT01560923, NCT02077881, NCT02073123, NCT02052648, NCT01042535) (Austin and Rendina, 2014).
Le méthyl-thiohydantoïne-tryptophane (MHT-Trp) a également montré un effet anti-tumoral chez la souris en bloquant IDO (Muller et al., 2005). Bien que des noms différents leur aient été longtemps attribués, le MHT-Trp est en fait la même molécule que la nécrostatine-1, un composé très souvent utilisé pour bloquer la nécrose cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Vandenabeele et al., 2013).

Récemment, de nouveaux inhibiteurs de IDO-1 et/ou IDO-2 ont été développés comme l'hydroxyamidine INCB024360 (Incyte) (Liu et al., 2010), actuellement en cours d'essais thérapeutiques de phase II dans le traitement des cancers (NCT01604889, NCT01685255, NCT01822691) ou l'Amg-1 (Amgen) (Meininger et al., 2011).

En plus de ces composés qui bloquent préférentiellement l'action de IDO-1 et/ou de IDO-2, certaines molécules ont été récemment développées pour bloquer à la fois l'action de IDO-1, de IDO-2 et de TDO. C'est le cas du Norharman (Austin and Rendina, 2014). De façon très surprenante, plusieurs imidazoles antifongiques (comme le micronazole, l'éconazole ou le clotrimazole) sont également capables de bloquer l'action de IDO-1, IDO-2 et TDO (Bakmiwewa et al., 2012).

III. Influence de IDO sur la réponse immunitaire

1. Rôle de IDO dans la tolérance immunitaire

L'expression de IDO a été mise en évidence dans de nombreux contextes physiologiques ou pathologiques. Dans la plupart de ces situations, les changements métaboliques induits par IDO participent au rétrocontrôle de la réponse inflammatoire et à l'instauration d'une tolérance immunitaire qui peut être bénéfique ou néfaste pour l'individu en fonction du contexte (Munn and Mellor, 2013).

A la différence des souris déficientes en *Foxp3* ou en *CTLA-4*, les souris déficientes en *IDO-1* ne développent pas spontanément de pathologies auto-immunes sévères, ce qui indique que IDO n'est pas une protéine cruciale de la tolérance centrale (tolérance immunitaire vis-à-vis des antigènes du « soi » développée dans les organes lymphoïdes primaires). A l'inverse, de nombreux arguments plaident en faveur d'un rôle important de IDO dans la

tolérance périphérique (tolérance immunitaire vis-à-vis des antigènes du « soi » ou du « non-soi » développée dans les organes lymphoïdes secondaires). En effet, le blocage de IDO inhibe le développement d'une tolérance périphérique vis-à-vis des nouveaux antigènes rencontrés par le système immunitaire tels que les antigènes apportés par un organe greffé ou par le fœtus d'une femme enceinte, favorisant ainsi le rejet allogénique de la greffe ou du fœtus (Guillonneau et al., 2007; Munn et al., 1998). De plus, le transfert de gènes codant pour IDO dans des tissus allogreffés crée une tolérance immunitaire *de novo* vis-à-vis de ces tissus, sans qu'aucun autre immunosuppresseur ne soit nécessaire (Iken et al., 2012; Liu et al., 2006). Enfin, l'exposition répétée de souris *IDO*$^{-/-}$ à des cellules apoptotiques favorise l'auto-réactivité vis-à-vis des antigènes du « soi » présents dans ces cellules apoptotiques et induit une pathologie auto-immune lupus-*like* chez l'animal (Ravishankar et al., 2012). Ces résultats indiquent que IDO est impliquée dans l'ensemble de la tolérance immunitaire périphérique, à la fois vis-à-vis des antigènes du « soi » et du « non-soi ».

2. Expression de IDO par les cellules présentatrices d'antigènes

Comme indiqué précédemment, les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) sont les principales cellules productrices de IDO au cours de la réponse inflammatoire (Mellor and Munn, 2004; Munn and Mellor, 2013). Certains sous-types de DCs ont été particulièrement impliqués dans l'expression élevée de IDO tels que les DCs CD8^{+} chez la souris et certaines populations de pDCs (Grohmann et al., 2000; Mellor et al., 2003; Munn et al., 2004b). L'expression de IDO par les pDCs a notamment été associée au contrôle de l'inflammation durant les allergies (Grohmann et al., 2007), au contrôle de pathologies auto-immunes comme le diabète de type I (Fallarino et al., 2009; Saxena et al., 2007), et à l'immunosuppression qui accompagne l'infection par le VIH (Onodera et al., 2009) et les cancers (Sharma et al., 2007).

Effet métabolique de IDO sur le microenvironnement des CPAs

L'expression de IDO dans les CPAs induit une déplétion en Try et une accumulation en kynurénines dans les cellules elles-mêmes et dans leur microenvironnement. A la différence des CPAs, les lymphocytes T situés dans le microenvironnement sont très sensibles à ces variations métaboliques qui altèrent leur prolifération et leur différenciation (voir ci-dessous). Il a été démontré que les CPAs possèdent des mécanismes d'efflux entre le Try et les kynurénines qui leur permettent de supporter la déplétion en Try intracellulaire due à l'activation de IDO (Kaper et al., 2007; Seymour et al., 2006; Wagner et al., 2001). Ces

mécanismes pourraient permettre aux CPAs d'accumuler le Try d'origine extracellulaire et d'expulser hors de la cellule les kynurénines en excès. Ces phénomènes d'échanges contribueraient alors un peu plus à la déplétion en Try dans le microenvironnement et à l'accumulation de kynurénines toxiques pour les lymphocytes T situés à proximité.

Effet tolérogène de IDO sur les CPAs et leur microenvironnement

L'expression de IDO oriente les CPAs vers un phénotype tolérogène. En effet, après stimulation *in vitro* par l'IFN-γ puis réinjection *in vivo* à la souris, les DCs $CD8^+$ murines ne parviennent plus à activer efficacement les lymphocytes T. L'ajout de 1-MT lors de l'étape de stimulation *in vitro* restaure la capacité des DCs $CD8^+$ à activer les lymphocytes T, ce qui suggère que IDO joue un rôle important dans l'orientation tolérogène des DCs (Grohmann et al., 2000). De manière intéressante, il a été observé que l'expression de IDO par certaines DCs (DCs IDO^+) bloque l'activation des lymphocytes T par ces DCs IDO^+ mais aussi par les DCs IDO^- présentes dans le microenvironnement (Mellor and Munn, 2004; Mellor et al., 2003; Munn et al., 2004b). Cette observation suggère que les DCs IDO^+ jouent un rôle dominant dans le microenvironnement, ce qui amplifie l'action de IDO. L'effet des DCs IDO^+ sur les autres CPAs voisines pourrait impliquer l'intervention de lymphocytes Tregs et/ou la libération de TGF-β. Les lymphocytes Tregs et le TGF-β sont à la fois activés par IDO et activateurs de l'expression de IDO (Voir ci-dessus et Figure 19). Il a ainsi été suggéré une boucle de rétrocontrôles positifs entre les DCs IDO^+, les lymphocytes Tregs et le TGF-β qui permet de maintenir un environnement immunotolérant durable bien au-delà de l'effet purement métabolique de IDO sur la concentration en Try du microenvironnement (Belladonna et al., 2009; Puccetti and Grohmann, 2007).

3. Impact de IDO sur les lymphocytes T

3.1. La déplétion en tryptophane

Comme toutes les cellules, les cellules du système immunitaire doivent avoir un accès suffisant à l'ensemble des acides aminés pour maintenir leur métabolisme et proliférer. Lorsqu'elles sont activées par la rencontre avec un antigène, ce besoin en acides aminés augmente considérablement. La perte de la biodisponibilité d'un acide aminé peut donc en elle-même compromettre la réponse immunitaire en réduisant la prolifération, la différenciation, la maturation ou la migration des cellules immunes (McGaha et al., 2012).

Le « stress » métabolique lié aux variations des concentrations en acides aminés est détecté par différents *sensors* dans la cellule, entrainant des perturbations profondes dans le métabolisme et le fonctionnement cellulaire. Parmi ces *sensors*, les protéines GCN2 (*general control nonderepressible 2*) et mTOR (*mammalian target of rapamycin*) sont importantes à considérer. La kinase GCN2 est activée par l'accumulation d'ARNt libres (non chargés en acide aminés) dans la cellule. Elle agit en bloquant le facteur initiateur de la traduction eIF2A (*eukaryotic translation initiation factor* 2A), conduisant à l'arrêt de la traduction d'une majorité de transcrits cellulaires et une interruption du cycle cellulaire (Raina and Ibba, 2014). La protéine mTOR détecte et intègre de multiples signaux métaboliques, énergétiques et hormonaux de l'environnement cellulaire pour assurer la croissance et l'homéostasie de la cellule (Laplante and Sabatini, 2012). Elle est située à un carrefour de plusieurs voies de signalisation cellulaire et joue un rôle clé dans l'activation, la différenciation et le fonctionnement des cellules du système immunitaire (Powell et al., 2012).

La déplétion en Try induite par l'activation de IDO est détectée par les *sensors* GCN2 et mTOR dans les lymphocytes T, ce qui inhibe leur activation et leur prolifération (Figure 20). En effet, l'activation de la kinase GCN2 dans les lymphocytes T $CD8^+$ bloque la progression du cycle cellulaire et induit une anergie fonctionnelle (Munn et al., 2005). Dans les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs, l'activation de GCN2 bloque la différenciation en lymphocytes Th17 (Sundrud et al., 2009) et favorise à la fois la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Tregs et l'activation des lymphocytes Tregs matures *in vitro* (Fallarino et al., 2006; Sharma et al., 2007). *In vivo*, la délétion du gène *GCN2* dans les lymphocytes T suffit à rendre ces cellules insensibles à l'action des DCs IDO^+, ce qui suggère que GCN2 joue un rôle clé dans le blocage de la prolifération des lymphocytes T induite par IDO (Munn et al., 2005). De la même manière, l'inhibition de mTOR induite par la déplétion en Try pourrait contribuer au blocage de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T (McGaha et al., 2012; Metz et al., 2012b; Munn and Mellor, 2013). Les lymphocytes T sont particulièrement sensibles à l'inhibition de mTOR, comme en témoigne l'usage clinique de la rapamycine/sirolimus (inhibiteur de mTOR) comme immunosuppresseur de la réponse cellulaire T (Laplante and Sabatini, 2012).

3.2. L'accumulation de kynurénines

Les kynurénines générées durant la dégradation du Try sont des composés biologiquement actifs qui contribuent à réguler le fonctionnement du système nerveux central (Campbell et al., 2014a)(Campbell et al., 2014b), la pression artérielle (Wang et al., 2010b) et la réponse immunitaire (Munn and Mellor, 2013). Les lymphocytes T sont particulièrement sensibles à l'action de certaines kynurénines (Figure 20). Par exemple, il a été observé que la kynurénine

(Kyn), la 3-hydroxykynurénine (3-HK) et l'acide 3-hydroxyanthranilique (3-HAA) inhibent la prolifération des lymphocytes T activés *in vitro* (Frumento et al., 2002; Terness et al., 2002). Le 3-HAA et l'acide quinolinique stimulent l'apoptose dans les thymocytes et les lymphocytes Th1 *in vitro* et induisent une déplétion en thymocytes $CD4^+CD8^+$ *in vivo* (Fallarino et al., 2002). En plus de leur impact sur la prolifération des lymphocytes T, les kynurénines influencent la différenciation des lymphocytes T naïfs. Ainsi, la Kyn, la 3-HK, le 3-HAA et l'acide quinolinique inhibent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 mais stimulent leur différenciation en lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ *in vitro* (Desvignes and Ernst, 2009; Fallarino et al., 2006). *In vivo*, l'administration de kynurénines à des souris favorise l'immunotolérance et réduit l'inflammation dans différents modèles de pathologies inflammatoires ou allergiques (Criado et al., 2009; Taher et al., 2008). De la même manière, l'injection de Kyn et de 3-HAA à des souris allogreffées inhibe la réponse cellulaire T allogénique et augmente significativement la survie du greffon (Bauer et al., 2005).

Les kynurénines sont des ligands pour *l'aryl hydrocarbon receptor* (AhR), un facteur de transcription activé par la fixation de ligands endogènes ou exogènes. L'AhR a de multiples fonctions au cours de la réponse immunitaire (Stockinger et al., 2014). La fixation de kynurénines sur l'AhR a un effet immunosuppresseur en favorisant la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocytes Tregs (Mezrich et al., 2010), en inhibant l'immunité anti-tumorale (Opitz et al., 2011) et en réduisant l'immunogénicité des DCs (Nguyen et al., 2010).

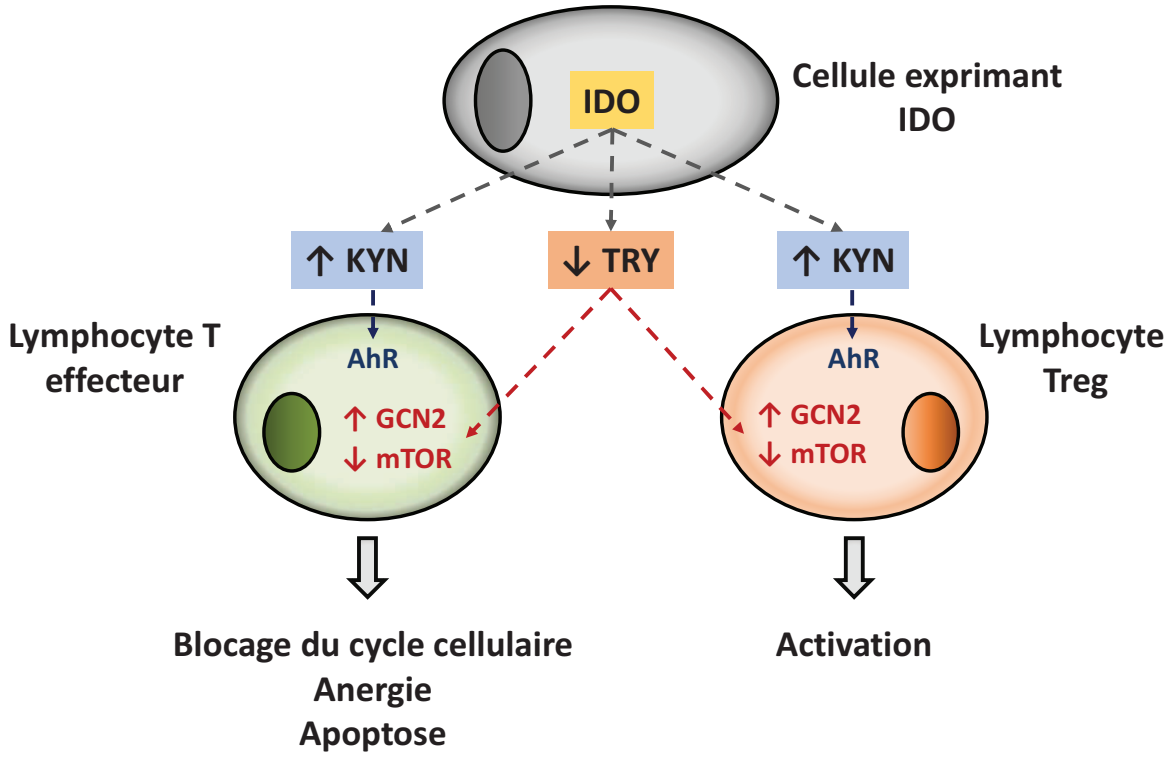


Figure 20 : Régulation des lymphocytes T par IDO.

L'activation de IDO dans une cellule (cellule présentatrice d'antigènes par exemple) induit une déplétion en tryptophane et une accumulation de kynurénines dans le microenvironnement. Les lymphocytes T sont sensibles à ces variations métaboliques. La baisse des concentrations en tryptophane stimule la kinase GCN2 et inhibe la protéine mTOR dans les lymphocytes T, tandis que certaines kynurénines se fixent sur le facteur de transcription AhR pour l'activer. En conséquence, la prolifération des lymphocytes T effecteurs est inhibée et les cellules présentent un état d'anergie fonctionnelle. A l'inverse, la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Tregs est augmentée et les lymphocytes Tregs matures sont activés. GCN2 : general control nonderepressible 2 ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; AhR : aryl hydrocarbon receptor. Adapté de (Munn and Mellor, 2013).

3.3. Profil général de la réponse lymphocytaire T en présence de IDO

Collectivement, la baisse des concentrations en Try et l'accumulation des kynurénines inhibe la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ activés et induit un état d'anergie (Figure 20). En influant sur la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs, l'expression de IDO modifie l'équilibre des sous-populations lymphocytaires Tregs et Th17 au profit des Tregs (Desvignes and Ernst, 2009; Fallarino et al., 2006; Terness et al., 2002).

En contexte inflammatoire et sous l'influence de l'IL-6, les lymphocytes Tregs présents dans les ganglions lymphatiques peuvent être reprogrammés pour être convertis en lymphocytes

inflammatoires Th17 (Sharma et al., 2009). Ici encore, l'expression de IDO bloque cette reprogrammation des lymphocytes Tregs et leur conversion en Th17 dans les ganglions lymphatiques *in vivo* (Baban et al., 2009; Sharma et al., 2009).

L'anergie fonctionnelle des lymphocytes T, l'apoptose des Th1 et la rupture de l'équilibre Tregs/Th17 est un moyen d'éviter une réponse cellulaire T excessive et le développement de pathologies auto-immunes. Cet état peut néanmoins s'avérer néfaste pour l'hôte dans le cas de cancers ou de certaines infections (infection par le VIH par exemple) qui nécessitent une réponse lymphocytaire T suffisamment robuste pour éliminer la tumeur ou l'agent pathogène (Favre et al., 2010a)(Favre et al., 2010b).

IV. Implication de IDO en pathologie

Compte-tenu de son rôle dans le métabolisme du Try et dans l'immunorégulation, IDO est suspectée de contribuer à de nombreux processus pathologiques. Nous aborderons brièvement l'impact de IDO sur certaines pathologies non-infectieuses avant de nous focaliser sur le rôle ambivalent joué par IDO lors des infections.

1. Pathologies non-infectieuses

1.1. Tolérance materno-foetale

Historiquement, le rôle immunorégulateur de IDO fut découvert en 1998, lorsque Munn *et al.* observèrent que l'administration de 1-MT à des souris en gestation induisait un rejet allogénique du fœtus (Munn et al., 1998). Depuis, l'impact de IDO sur la tolérance maternelle aux tissus fœtaux a été particulièrement étudié. Chez la femme, IDO est exprimée dès la formation du blastocyste (6ème jour) et son expression persiste dans le placenta tout au long de la grossesse (Kudo et al., 2004). En bloquant l'activation des lymphocytes T maternels, l'expression placentaire de IDO pourrait jouer un rôle clé dans la tolérance périphérique maternelle au fœtus (Kudo et al., 2004). Puisque IDO possède un rôle antimicrobien indépendant de son activité immunorégulatrice (voir ci-dessous), il a été suggéré que l'expression placentaire de IDO pourrait également participer aux mécanismes de défense antimicrobienne visant à protéger le fœtus (Sedlmayr et al., 2014). Une augmentation progressive du ratio des concentrations sériques Kyn/Try, témoin de l'activité de IDO, est observée lors de la grossesse (Schröcksnadel et al., 2003). Il a été suggéré que cette variation systémique de la biodisponibilité du Try pourrait déréguler la synthèse de

sérotonine et contribuer aux troubles de l'humeur observés pendant la grossesse et/ou le post-partum (Kohl et al., 2005; Maes et al., 2002).

1.2. Transplantation d'organes

La transplantation de tissus ou d'organes constitue une autre forme de stimulation allogénique du système immunitaire. Lors de l'allogreffe de foie chez la souris, le blocage de IDO par le 1-MT induit le rejet du greffon, suggérant que IDO joue un rôle important dans l'immunotolérance vis-à-vis de l'organe transplanté (Miki et al., 2001). En faveur de cette idée, il a été observé que la transplantation de cellules pancréatiques exprimant IDO chez la souris augmente la survie du greffon en inhibant la réponse des lymphocytes T (Alexander et al., 2002). De même, il a récemment été montré que IDO contribuait à l'immunotolérance vis-à-vis du greffon dans un modèle murin de transplantation cardiaque (Sucher et al., 2012). Ces résultats suggèrent que l'activation pharmacologique de IDO pourrait trouver sa place dans l'arsenal thérapeutique chez le patient transplanté.

1.3. Cancers

IDO est exprimée dans de nombreux cancers chez l'homme (Godin-Ethier et al., 2011). Les cellules cancéreuses et les CPAs expriment IDO à la fois sur le site tumoral et dans les ganglions périphériques (Munn et al., 2004b). Une expression élevée de IDO est associée à la progression tumorale et à la survenue de métastases dans les cancers colorectaux, utérins ou du nasopharynx (Brandacher et al., 2006; Ino et al., 2006; Liu et al., 2009). De la même manière, les patients qui présentent des niveaux élevés d'activation de IDO ont un taux de survie diminué dans les cancers utérins ou pulmonaires (Astigiano et al., 2005; Inaba et al., 2010). Ces observations suggèrent que IDO joue un rôle délétère pour le patient au cours des cancers et favorise la progression tumorale. Expérimentalement, la transfection de *IDO-1* dans des cellules tumorales ovariennes humaines secondairement greffées à des souris accroit la progression tumorale par rapport à des cellules qui n'expriment pas IDO (Yoshida et al., 2008).

L'expression de IDO par la tumeur altère la réponse adaptative cellulaire et contribue à instaurer un microenvironnement tolérogène qui facilite l'échappement tumoral à l'immunosurveillance (Balachandran et al., 2011; Uyttenhove et al., 2003). Chez les patients atteints par un cancer du côlon, de l'ovaire ou de l'endomètre, une expression élevée de IDO est associée à une diminution du nombre de lymphocytes T $CD3^+$ et/ou $CD8^+$ sur le site tumoral (Brandacher et al., 2006; Inaba et al., 2009). A l'inverse, l'expression de IDO est corrélée à un niveau élevé de lymphocytes Tregs sur le site tumoral et/ou dans les ganglions

métastatiques (Curti et al., 2010; Mansfield et al., 2009; Witkiewicz et al., 2008). En facilitant le recrutement et/ou l'émergence des lymphocytes Tregs autour de la tumeur, IDO pourrait contribuer significativement à la progression tumorale (Josefowicz et al., 2012).

Il est intéressant de constater que certains gènes codant pour des inhibiteurs de IDO tels que *BIN1* (un inhibiteur de la transcription de *IDO-1*) et *SOCS3* (qui accélère la dégradation de IDO par le protéasome) sont fréquemment inhibés dans les tumeurs (Ino et al., 2008; Muller et al., 2005; Niwa et al., 2005; Orabona et al., 2008).

Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de IDO sont actuellement en cours d'essais thérapeutiques de phases I ou II dans le traitement des cancers (Austin and Rendina, 2014). Ils visent à diminuer l'immunotolérance induite par IDO dans le microenvironnement tumoral et à restaurer une immunité anti-tumorale efficace. Chez l'animal, l'administration de 1-MT comme seul traitement est suffisant pour ralentir la croissance tumorale (Friberg et al., 2002; Uyttenhove et al., 2003), sans pour autant aboutir à une élimination complète de la tumeur (Muller et al., 2005). L'ajout de 1-MT aux chimiothérapies antitumorales conventionnelles augmente la régression tumorale chez la souris (Muller et al., 2005), suggérant que les inhibiteurs de IDO pourraient trouver leur place dans le traitement des cancers au côté des autres thérapies.

1.4. Troubles neurologiques et psychiatriques

Le Try est le précurseur de la sérotonine, un neurotransmetteur essentiel à la régulation de l'humeur et au fonctionnement du système nerveux central (SNC). Compte-tenu de son rôle dans la biodisponibilité du Try, IDO pourrait jouer un rôle important dans certaines pathologies neurologiques ou psychiatriques (Campbell et al., 2014a). En faveur de cette idée, il a été observé que la déplétion aiguë en Try affecte la régulation de l'humeur via une baisse des concentrations en sérotonine (Young and Leyton, 2002). Chez les patients souffrant d'algies chroniques ou de dépression, une augmentation du taux de Kyn a été rapportée, suggérant une implication de IDO dans ces affections (Dantzer et al., 2008a). Certaines kynurénines ont un impact direct sur le fonctionnement du SNC. Ainsi, l'acide kynurénique protège le SNC en bloquant l'activation des récepteurs au glutamate de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate) qui sont essentiels à la mémoire et à la plasticité synaptique mais dont l'hyperexcitation incontrôlée peut entrainer la mort du neurone (phénomène d'excitotoxicité) (Ganong and Cotman, 1986). A l'inverse, l'acide quinolinique, stimule ces mêmes récepteurs NMDA en agissant comme une « excitotoxine » (Schwarcz et al., 1983). Enfin, l'acide xanthurénique a récemment été impliqué dans la neurotransmission médiée par le glutamate (Copeland et al., 2013). Schématiquement, la voie des kynurénines peut

être divisée en 2 branches par rapport à son action sur le SNC : une branche « neurotoxique » ou « excitotoxique » médiée par la *kynurénine 3-monooxygénase* et aboutissant à la formation d'acide quinolinique et une branche « neuroprotectrice » ou « inhibitrice », médiée par la *kynurénine oxoglutarate-transaminase* et aboutissant à la formation d'acide kynurénique. La dérégulation de l'équilibre entre les concentrations cérébrales d'acides quinolinique et kynurénique apparaît comme un mécanisme majeur dans la genèse de troubles neurodégénératifs ou psychiatriques (Campbell et al., 2014a)(Campbell et al., 2014a).

2. Pathologies infectieuses

2.1. Le double visage de IDO au cours des infections

Avant que le rôle immunorégulateur de IDO ne soit découvert, la dégradation du Try était avant tout perçue comme un mécanisme de l'immunité innée permettant de lutter contre les infections (Taylor and Feng, 1991). En effet, bien que de nombreux microorganismes puissent synthétiser leur propre Try, certains en sont incapables et dépendent entièrement du Try d'origine exogène (phénomène d'auxotrophie). Ces microorganismes sont donc très sensibles à la déplétion en Try dans leur environnement. Ce sont volontiers des pathogènes intracellulaires ou vivant en étroite association avec la cellule hôte tels que *Chlamydia pneumoniae*, *Toxoplasma gondii* ou certaines mycobactéries (Barth and Raghuraman, 2014; Schmidt and Schultze, 2014). En induisant une déplétion intracellulaire et locale en Try, IDO joue indiscutablement un rôle antimicrobien contre ces agents pathogènes.

La découverte du rôle immunomodulateur de IDO au cours de certaines situations pathologiques a amené à reconsidérer l'impact de IDO lors des infections. En participant à la tolérance immunitaire périphérique, l'expression de IDO altère l'efficacité des mécanismes de défense antimicrobiens et favorise la persistance de certaines infections parasitaires, bactériennes, fongiques et virales.

IDO est donc une protéine au double visage au cours des infections. Selon son rôle dominant – antimicrobien ou tolérogène – vis-à-vis d'un microorganisme, IDO pourra favoriser la résolution ou au contraire la persistance de l'infection.

2.2. Infections bactériennes et parasitaires

Rôle antimicrobien de IDO

Le rôle antimicrobien de IDO a été découvert en 1984, lorsque Pfefferkorn *et al*. ont observé que la croissance du parasite *Toxoplasma gondii* dans les fibroblastes humains était inhibée par la dégradation du Try induite par l'IFN-γ (Pfefferkorn, 1984). L'apport exogène de Try dans le milieu de culture restaurait la croissance du parasite (Schmitz et al., 1989).

Des résultats similaires ont ensuite été obtenus avec différentes bactéries auxotrophes pour le Try comme *Chlamydia psittaci* (Byrne et al., 1986), *Chlamydia pneumoniae* (Njau et al., 2009) et certaines mycobactéries comme *Mycobacterim avium* (Hayashi et al., 2001). En plus de la déplétion en Try, l'accumulation de kynurénines contribue à l'effet antimicrobien de IDO. Ainsi, la Kyn et la 3-HK exercent un effet bactéricide direct sur *Listeria monocytogenes* dans les DCs et les macrophages (Niño-Castro et al., 2014).

Rôle de IDO dans la tolérance immunitaire et la persistance des infections

Comme détaillé précédemment, l'expression de IDO altère profondément la réponse lymphocytaire T lors de l'inflammation et lors des infections. Chez les patients atteints de tuberculose, l'expression de IDO est augmentée dans les sécrétions respiratoires et les épanchements pleuraux et associée à une baisse de la prolifération des lymphocytes Th1 (Almeida et al., 2009; Li et al., 2011). La mise en place d'un traitement antibiotique ou le blocage pharmacologique de IDO contribuent à restaurer une immunité cellulaire effectrice contre *Mycobacterium tuberculosis*, suggérant que l'expression de IDO induite par la bactérie joue un rôle important dans la persistance de l'infection (Li et al., 2011). La tuberculose, ainsi que d'autres infections bactériennes comme la listériose (*Listeria monocytogenes*) sont associées à la formation de granulomes (Davis and Ramakrishnan, 2009; Pamer, 2004). Les granulomes sont des structures immunes compactes destinées à contenir l'infection bactérienne et à prévenir la diffusion de l'agent pathogène dans l'organisme. Ils contiennent un agrégat de CPAs entouré par une couronne de lymphocytes (Guirado and Schlesinger, 2013). IDO est fortement exprimée dans les granulomes de patients atteints de tuberculose (von Bubnoff et al., 2011) et de listériose (Popov et al., 2006), notamment par certaines sous-populations de DCs et de macrophages. Au centre des granulomes de tuberculose, les lymphocytes Tregs sont abondants et associés à une concentration élevée de TGF-β, tandis que les lymphocytes T $CD8^+$ présents en périphérie de la lésion ont une faible capacité de cytolyse et de sécrétion d'IFN-γ (Rahman et al., 2009). L'expression élevée de IDO pourrait contribuer à ces désordres immunologiques et favoriser la persistance du pathogène. En faveur de cette idée, il a été démontré *in vitro* que les DCs infectées par *Listeria monocytogenes* et exprimant IDO inhibent l'activation et la prolifération des lymphocytes T à leur contact (Popov et al., 2008). *Listeria monocytogenes* est un très bon exemple de la dualité de IDO, puisque IDO peut à la fois ralentir la croissance

de *Listeria monocytogenes* et favoriser sa persistance via l'échappement immunitaire (Popov et al., 2006, 2008).

De manière intéressante, l'impact de IDO sur le devenir de l'infection pourrait également varier selon le type de cellules infectées. Ainsi, dans les DCs dérivées des monocytes, IDO exerce avant tout un rôle antibactérien sur *Chlamydia pneumoniae* (Njau et al., 2009). A l'inverse, l'expression de IDO dans les monocytes TPH-1 induit un état de « latence » de *Chlamydia pneumoniae* suspecté de contribuer à sa persistance et à sa diffusion dans l'organisme (Bellmann-Weiler et al., 2010; Hogan et al., 2004).

Expression de IDO au cours des infections sévères

Plusieurs cohortes ont mis en évidence une augmentation du ratio des concentrations sériques Kyn/Try au cours des sepsis bactériens liés à *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Escherichia Coli*, ou lors de pneumonies communautaires (Darcy et al., 2011; Huttunen et al., 2010; Suzuki et al., 2011; Tattevin et al., 2010). Cliniquement, l'expression de IDO était corrélée à la sévérité du tableau clinique et à la mortalité dans ces études (Darcy et al., 2011; Huttunen et al., 2010; Suzuki et al., 2011; Tattevin et al., 2010). Biologiquement, l'expression de IDO chez ces patients septiques était associée à des concentrations élevées d'IFN-γ et d'IL-10 et à une diminution du nombre de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Darcy et al., 2011). Les monocytes circulants étaient une source majeure d'expression de IDO chez ces patients (Tattevin et al., 2010). Une augmentation des concentrations Kyn/Try a également été observée au cours de la tuberculose et associée à un mauvais pronostic (Suzuki et al., 2012).

Le rôle joué par IDO au cours de ces infections sévères reste à déterminer. L'expression de IDO pourrait être le reflet d'une réponse immunitaire innée intense en réponse à l'invasion bactérienne. Une autre hypothèse serait que IDO participe activement aux dysfonctionnent du système immunitaire et contribue à la sévérité de l'infection. En faveur de cette dernière hypothèse, il a été observé que le blocage génétique (souris $IDO^{-/-}$) ou pharmacologique de IDO augmente la survie de souris en cas de choc endotoxinique induit par le LPS (Jung et al., 2009). Bien que ce modèle ne soit pas pleinement transposable aux sepsis humains, il plaide en faveur de l'implication de IDO dans la survenue de manifestations sévères en présence de motifs bactériens.

2.3. Infections virales

IDO est exprimée dans de nombreuses infections virales

Une élévation du ratio des concentrations sériques Kyn/Try est observée dans de nombreuses infections virales telles que la dengue, les hépatites B et C ou l'infection par le VIH (Tableau 1). L'expression de IDO est alors souvent corrélée à la sévérité de l'infection virale et/ou à une mortalité accrue (Tableau 1) (Byakwaga et al., 2014).

L'expression de IDO est également détectable au sein de l'organe infecté par un virus, comme le poumon lors de la grippe (Yoshida et al., 1979) ou le foie lors d'hépatites B (Iwamoto et al., 2009) ou C (Larrea et al., 2007).

Tableau 1 : Elévation du ratio des concentrations sériques Kyn/Try lors d'infections virales chez l'homme.

Virus	Phase de l'infection	Effectif	Association à la sévérité	Références
VIH	Chronique	278	↑Progression ↓Taux LT $CD4^+$	(Huengsberg et al., 1998)
	Chronique	435	↑Mortalité ↑Virémie VIH ↓Taux LT $CD4^+$	(Byakwaga et al., 2014)
	Chronique	253	↑Progression ↓Taux LT $CD4^+$ ↓Th17 / ↑Tregs Translocation bactérienne	(Jenabian et al., 2013)
	Chronique	86	↑Progression ↓Taux LT $CD4^+$ ↑ Activation immune systémique ↑ LPS circulant ↓Th17 / ↑Tregs	(Favre et al., 2010a)

VHB	Chronique	50	↑Virémie VHB ↑ ALAT ↓LT $CD4^+$ et $CD8^+$	(Chen et al., 2009)
VHC	Chronique	140	Non évaluée	(Larrea et al., 2007)
	Chronique	213	↑Fibrose/inflammation hépatique	(Higashitani et al., 2013)
Puumala	Aiguë	102	↑CRP ; ↑Leucocytes ↑Créatininémie ; Diurèse ↑Durée hospitalisation	(Outinen et al., 2011)
Dengue	Aiguë (fébrile)	21	Non évaluée	(Becerra et al., 2009)
EBV	Chronique active	30	↑Virémie EBV ↑ Fatigue chronique ↑ Fièvre	(Bellmann-Weiler et al., 2008)

ALAT : alanine aminotransférase ; CRP : protéine C réactive ; LT : lymphocytes T ; LPS : lipopolysaccharide

Rôle antiviral de IDO

A la différence de certaines bactéries et de parasites, les virus ne sont pas touchés par l'auxotrophie. Pourtant, l'expression de IDO inhibe la réplication de nombreux virus *in vitro* comme les virus herpès simplex (HSV) 1 et 2, le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de la vaccine ou certains arbovirus (Tableau 2) (Adams et al., 2004a, 2004b; Becerra et al., 2009; Bodaghi et al., 1999; Mao et al., 2011; Terajima and Leporati, 2005; Yeung et al., 2012).

Comme observé avec les bactéries et les parasites, l'apport exogène de Try dans le milieu de culture restaure la réplication virale, ce qui indique que l'effet antiviral de IDO est directement lié à son action métabolique sur le Try (Adams et al., 2004a; Bodaghi et al., 1999; Mao et al., 2011; Yeung et al., 2012).

Tableau 2 : Effet antiviral de IDO.

Virus	Cellules	Effet	Références
CMV	Cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes primaires	↓ Réplication virale	(Bodaghi et al., 1999)
HSV-1	Astrocytes humains Cellules astrocytaires (86HG39) Cellules alvéolaires (A549)	↓ Réplication virale	(Adams et al., 2004a; Heseler et al., 2008)
HSV-2	Cellules astrocytaires (86HG39) Cellules HeLa	↓ Réplication virale	(Adams et al., 2004b)
VHB	Cellules hépatocytaires (HepG2, HepDE19)	↓ Réplication virale	(Mao et al., 2011)
Virus de la vaccine	Ostéosarcome	↓ Réplication virale	(Terajima and Leporati, 2005)
Virus West Nile	Macrophages	↓ Réplication virale	(Yeung et al., 2012)
Virus de l'encéphalite japonaise	Macrophages	↓ Réplication virale	(Yeung et al., 2012)
Virus de la dengue	Cellules dendritiques	↓ Réplication virale	(Becerra et al., 2009)

Rôle de IDO dans la tolérance immunitaire et la persistance des infections virales

En raison de ses propriétés immunomodulatrices, l'expression de IDO pourrait altérer la réponse immunitaire antivirale et favoriser la persistance et/ou la progression de l'infection (Tableau 1). Expérimentalement, il a été montré que le blocage génétique ou pharmacologique de IDO au cours de la grippe augmente les réponses lymphocytaires Th1 et Th17 et booste la production de cytokines pro-inflammatoires *in vivo* (Fox et al., 2013, 2014; Huang et al., 2013). Cette observation suggère que IDO inhibe l'immunité effectrice dirigée contre le virus de la grippe, ce qui peut à la fois éviter une activation immune trop intense et possiblement dommageable pour l'individu (action bénéfique pour l'hôte) et générer un environnement tolérogène favorable à la progression de l'infection (effet néfaste pour

l'hôte). Il a été suggéré que l'environnement tolérogène lié à l'expression pulmonaire de IDO au cours de la grippe pourrait également favoriser la survenue de surinfections bactériennes pulmonaires (van der Sluijs et al., 2006).

L'implication de IDO dans la persistance virale a été particulièrement bien documentée dans le cas du VIH. L'infection par le VIH induit une altération profonde de la réponse lymphocytaire T, marquée par une perte des capacités de prolifération des lymphocytes T, une déplétion en lymphocytes T $CD4^+$ et une accumulation de lymphocytes Treg (Larsson et al., 2013). IDO est exprimée au cours de l'infection par le VIH. Dans une récente cohorte de 435 patients infectés par le VIH en Ouganda, l'expression de IDO était corrélée à une virémie VIH élevée, une faible restauration du taux de lymphocytes T $CD4^+$ circulants et une augmentation de la mortalité (Byakwaga et al., 2014). Dans d'autres études, l'expression de IDO chez les patients infectés par le VIH favorisait la dérégulation de la balance des lymphocytes Th17/Tregs, la translocation microbienne depuis le tube digestif et l'activation immune systémique (Favre et al., 2010a; Jenabian et al., 2013). De manière intéressante, certains produits de dégradation du Try tels que l'acide 3-hydroxyanthranilique étaient tout particulièrement impliqués dans l'inversion du rapport entre les lymphocytes Th17 et Tregs (Favre et al., 2010a). L'ensemble de ces arguments plaide en faveur d'un rôle délétère de IDO au cours du VIH, en participant au sabotage de la réponse immunitaire et en favorisant la progression de la maladie. En conséquence, l'inhibition pharmacologique de IDO chez le patient infecté par le VIH pourrait significativement contribuer à restaurer une réponse immunitaire efficace et à réduire la progression de l'infection (Boasso et al., 2009).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Une augmentation du ratio des concentrations sériques Kyn/Try, témoin d'une activation de IDO, a été observée chez les patients chroniquement infectés par le VHC par rapport à des patients qui avaient éliminé spontanément le virus et à des sujets sains (Higashitani et al., 2013; Larrea et al., 2007). Des études chez les chimpanzés infectés par le VHC ont montré une augmentation de l'expression des ARNm de IDO dans le foie durant la phase aiguë. Chez les chimpanzés qui éliminaient spontanément le virus, l'expression hépatique de IDO diminuait rapidement. A l'inverse, l'expression hépatique de IDO persistait à des niveaux élevés chez les animaux qui développaient une hépatite C chronique (Larrea et al., 2007; Rollier et al., 2007a). A ce jour, les mécanismes moléculaires conduisant à l'expression de IDO au cours de l'hépatite C et l'impact de IDO sur l'infection par le VHC ne sont pas connus.

Les objectifs de ce travail de thèse ont d'abord été de préciser le rôle des hépatocytes dans l'expression de IDO au cours de l'hépatite C. Nous avons voulu déterminer si le VHC induit l'expression de IDO dans les hépatocytes et si la protéine IDO produite est fonctionnellement active. Nous avons également voulu définir les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression de IDO dans les hépatocytes au cours de l'infection par le VHC.

Puisqu'un rôle antiviral a été attribué à IDO dans plusieurs modèles *in vitro*, nous avons voulu évaluer si l'expression de IDO dans les hépatocytes infectés par le VHC est associée à la réponse immunitaire innée et si *IDO-1* appartient aux *Interferon-stimulated genes* (ISGs). Afin de mieux comprendre l'impact de l'expression de IDO sur le VHC, nous avons voulu préciser si l'expression de IDO limite la réplication du VHC dans des modèles *in vitro*.

Puisqu'un rôle immunorégulateur a été attribué à IDO dans plusieurs contextes infectieux et non-infectieux, nous avons voulu déterminer si l'expression de IDO par les hépatocytes infectés inhibe la prolifération des lymphocytes T activés situés dans le microenvironnement et si cette inhibition peut être efficacement bloquée par des inhibiteurs pharmacologiques de IDO.

La compréhension du rôle joué par IDO dans le développement de l'immunité anti-VHC et dans la persistance de l'infection pourrait permettre d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques ou vaccinales pour lutter contre l'hépatite C.

MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

1. Cellules primaires et lignées cellulaires

Les **hépatocytes primaires humains** (HPH) ont été isolés dans notre laboratoire à partir de résections hépatiques fournies par le Pr. P. Bachellier (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France) par un protocole de perfusion et de digestion à la collagénase (David et al., 1998) ou gracieusement fournis par le Dr. L. Richert (Kaly-Cell, Plobsheim, France). Les HPH ont été cultivés dans un milieu *William's E Medium* (Gibco/Life Technologies™, Grand Island, NY) supplémenté par 1,5 mg/ml d'albumine sérique bovine, 1 % d'acides aminés non essentiels (Gibco/Life Technologies™), 1 % d'Insuline-Transferrine-Sélénium (Gibco/Life Technologies™), 1 % de Glutamax (Gibco/Life Technologies™), 0,1 µmol/l de dexaméthasone en présence de pénicilline (100 UI/ml) et de streptomycine (100 µg/ml) et incubés à 37°C sous 5 % de CO_2. La morphologie et l'adhérence des cellules ont été vérifiées au microscope quotidiennement et aucune modification morphologique n'a été observée au cours des 5 jours de culture.

Les cellules de la lignée **Huh7.5.1** dérivent de la lignée Huh7 (provenant d'un carcinome hépatocellulaire bien différencié) et supportent des niveaux élevés de réplication du VHC *in vitro* (Zhong et al., 2005). Les cellules Huh7.5.1 ont été fournies gracieusement par le Dr. FV. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA ; MTA numéro 636) (Zhong et al., 2005). Les cellules Huh7.5.1 ont été cultivées dans un milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco/Life Technologies™) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Dominique Dutscher, Brumath, France), 1 % d'acides aminés non essentiels (Gibco/Life Technologies™), 50 µg/ml de gentamicine (Gibco/Life Technologies™) et incubées à 37°C sous 5 % de CO_2.

Les cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*, **PBMCs**) ont été isolées à partir de donneurs sains (EFS-Alsace, Strasbourg, France) par centrifugation à travers un gradient de Ficoll et cultivées dans un milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco/Life Technologies™) supplémenté par 10 % de SVF (Dominique Dutscher) et 50 µg/ml de gentamicine (Gibco/Life Technologies™) et incubées à 37°C sous 5 % de CO_2. La sélection des lymphocytes T $CD4^+$ a été effectuée à partir des PBMCs par chromatographie d'affinité en utilisant des microbilles magnétiques porteuses d'anticorps anti-CD4 (Miltenyi Biotech™, Auburn, CA).

Les cellules embryonnaires rénales de la lignée HEK 293T (ATCC® CRL-3216) ont été cultivées dans un milieu DMEM supplémenté par 10 % de SVF (Dominique Dutscher), 1 % d'acides aminés non essentiels (Gibco/Life Technologies™) et 50 µg/ml de gentamicine (Gibco/Life Technologies™) et incubées à 37°C sous 5 % de CO_2. La viabilité de l'ensemble des cellules utilisées a été vérifiée par coloration au bleu trypan 0,4 % (Sigma-Aldrich™, Saint-Louis, MO).

2. Stimulation des cellules par les interférons et quantification de l'IFN-γ

L'IFN-α et l'IFN-γ recombinants humains utilisés pour stimuler les HPH et les cellules Huh7.5.1 ont été obtenus respectivement auprès de Roche™ (Bâle, Suisse) et InterMune™ (Brisbane, CA). Les concentrations utilisées et les durées d'exposition des cellules aux IFNs sont précisées pour chaque expérience dans la section Résultats.

La quantification de l'IFN-γ dans les surnageants de culture lors des expériences de co-culture a été réalisée par une technique ELISA (eBioscience™, San Diego, CA) selon les recommandations du fournisseur.

II. Virus

1. Virus produits en culture cellulaire (VHCcc)

Production des VHCcc

La production de VHCcc a été réalisée par transfection de l'ARN du VHC de variant JFH1 (génotype 2a) dans des cellules Huh7.5.1 comme décrit initialement par Wakita *et al*. (Wakita et al., 2005). Pour cela, nous avons utilisé un plasmide pJFH1 contenant le génome entier de JFH1 en aval d'un promoteur T7 RNA (Wakita et al., 2005), gracieusement fourni par le Dr. T. Wakita (National Institue of Infectious Disease, Tokyo, Japon, MTA numéro 1664). L'ARN de JFH1 a été transcrit *in vitro* en utilisant le MEGAscript™ T7 Transcription kit (Life Technologies™) selon le protocole du fournisseur. Dix µg de l'ARN obtenu ont été électroporés dans une suspension de 6-8 x 10^6 cellules Huh7.5.1 (5 pulsations de 99 microsecondes séparées par un intervalle de 1 seconde à 820 V) puis les cellules ont été incubées à 37°C sous 5 % de CO_2 en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (LSB3). Après 72h, les surnageants contenant les particules virales ont été recueillis, centrifugés puis conservés à -80°C (Figure 21). Plusieurs sous-cultures des cellules Huh7.5.1 infectées ont été réalisées jusqu'à environ 20 jours post-transfection (observation d'une lyse cellulaire massive associée à une production virale importante), permettant une augmentation des

rendements de production virale. Les surnageants recueillis à chaque passage ont été centrifugés puis conservés à -80°C. La quantification des VHCcc dans les surnageants a été réalisée par une technique de *plaque assay* reposant sur la dilution en série des surnageants, l'infection des cellules Huh7.5.1 puis la quantification des cellules infectées par marquage avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine NS5A du VHC. En parallèle, l'ARN du VHC dans les sunageants a été quantifié par RT-PCR. Pour cela, l'ARN viral a été extrait grâce au kit QiAmp® viral RNA (Qiagen™, Venlo, Pays-Bas) puis amplifié en utilisant le SensiMix™ one-step kit (Bioline™, Londres, RU) sur thermocycleur Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science™/ Qiagen™, Sydney, Australie). Les amorces sens et anti-sens utilisées étaient respectivement 3'-AGY GTT GGG TYG CGA AAG-5'et 3'-CAC TCG CAA GCR CCC T-5'. La sonde utilisée était 3'FAM- TCA GGC AGT ACC ACA AGG-5'TAMRA. Les conditions d'amplifications étaient de 50 minutes à 48°C puis 10 minutes à 95°C, suivies de 45 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

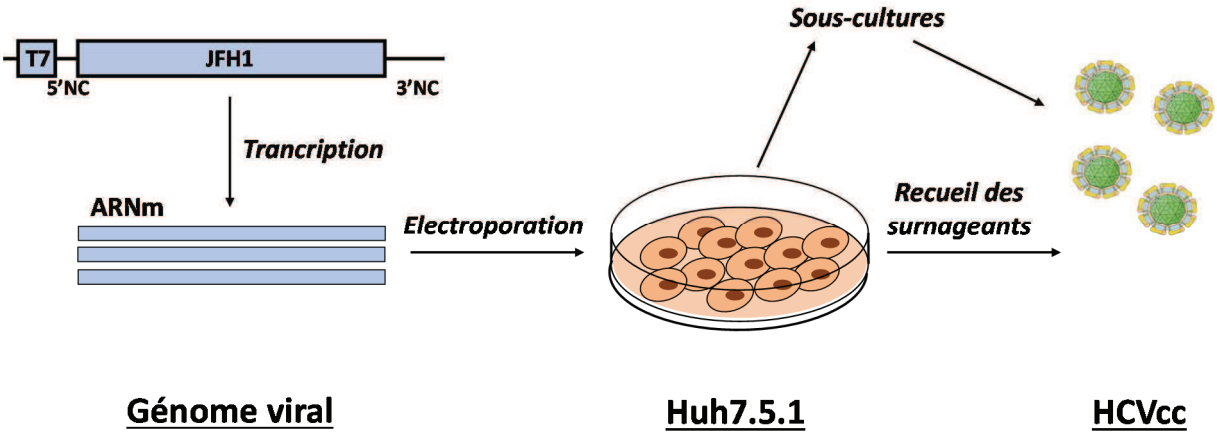


Figure 21 : Production des VHCcc.

Les ARNm provenant de la transcription du génome complet de l'isolat JFH1 sont électroporés dans des cellules Huh7.5.1. Après 72h, les particules de VHCcc sont récupérées dans le surnageant de culture. Plusieurs sous-cultures sont réalisées à partir des cellules Huh7.5.1 infectées, permettant d'augmenter les rendements de production virale.

Infections cellulaires avec les VHCcc

L'infection des HPH et des cellules Huh7.5.1 par les VHCcc a été réalisée à des *Multiplicity of Infection* (MOI) respectives de 0,1 et 0,05 pendant 3 heures à 37°C pour permettre l'entrée des particules virales. Les cellules ont ensuite été lavées avec une solution héparinée à 60 µg/ml pour détacher les particules virales fixées aux surfaces cellulaires puis lavées 2 fois au

PBS. La quantification de l'ARN du VHC a été réalisée par RT-PCR quantitative dans les lysats cellulaires à différents temps post-infection. L'inactivation des VHCcc par les rayons ultraviolets (UV) a été réalisée en plaçant 2 ml de surnageant contenant les virions sous une lampe à UV Vilber Lourmat® (VL-115.M, Marne-La-Vallée, France) pendant 20 minutes. L'absence de réplication des particules virales exposées aux UV a été vérifiée sur cellules Huh7.5.1.

2. Isolat clinique du VHC

Un isolat clinique du VHC a été obtenu à partir du sérum d'un patient infecté par un VHC de génotype 1b qui avait participé à un essai clinique (ClinicalTrials.gov identifier : NCT00638144). La charge virale du VHC dans le sérum, déterminée par la technique Abbott Realtime HCV sur l'automate Abbott m2000 sp (Abbott Molecular™, Des Plaines, IL), était de 8,82 $\log_{10}$ UI/ml. L'infection des HPH a été réalisée avec 50 µl de sérum selon le protocole décrit précédemment pour les VHCcc.

3. Pseudo-particules du VHC (VHCpp)

Production des VHCpp

Les pseudo-particules virales du VHC (VHCpp) exprimant les glycoprotéines d'enveloppe E1-E2 des VHC de génotype 1b (variant HCV-J) ou 2a (variant JFH1), et les pseudo-particules virales exprimant la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) ont été produites comme décrit initialement par Bartosch *et al.* (Bartosch et al., 2003a). Pour cela, des cellules HEK 293T ont été transfectées au phosphate de calcium avec les 3 vecteurs d'expression suivants : (1) un plasmide contenant les segments génétiques *GAG-POL* du virus de la leucémie murine (*Murine leukemia virus*, MLV), (2) un plasmide codant pour les protéines d'enveloppe E1-E2 du VHC (clones HCV-J ou JFH1), (3) un plasmide MLV-Luc contenant les *long terminal repeat* (LTR) 5' et 3' du MLV et codant pour le gène rapporteur de la luciférase. Quarante-huit heures après la transfection, les surnageants de culture contenant les VHCpp ont été recueillis puis filtrés à travers des filtres de 0,45 µm.

Infections cellulaires avec les VHCpp

Les VHCpp ont été incubées avec les cellules Huh7.5.1 pendant 3 heures à 37°C. Le surnageant a ensuite été retiré et les cellules ont été cultivées dans leur milieu habituel.

Après 72h, l'entrée des VHCpp dans les cellules Huh7.5.1 a été déterminée en mesurant l'activité de la luciférase grâce au réactif Luciferase Assay System (Promega™, Madison, WI) sur lecteur de plaque Mithras LB 940 (Berthold Technologies™, Bad Wildbad, Allemagne).

4. Réplicon subgénomique du VHC

Le réplicon subgénomique Rep-PI-Luc a été gracieusement fourni par le Dr. T. Jake Liang (Liver Diseases Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH, Bethesda, MD). Il comporte successivement de 5' en 3' : la région 5' non codante (5'NC) du VHC, l'IRES du poliovirus, le gène codant pour la luciférase de la luciole (*Photinus vulgaris*), l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), les gènes codant pour les protéines non structurales NS3 à NS5B de l'isolat Con1 du VHC (Figure 22) (Lohmann et al., 2003). L'ARN du réplicon a été transcrit *in vitro* en utilisant le MEGAscript™ T7 Transcription kit (Life Technologies™) en respectant le protocole du fournisseur. Dix µg de l'ARN obtenu ont été électroporés dans une suspension de 6-8 x 10^6 cellules Huh7.5.1 (5 pulsations de 99 microsecondes séparées par un intervalle de 1 seconde à 820 V) puis les cellules ont été incubées à 37°C sous 5 % de CO_2. Pour les expériences de co-électroporation, 3 µg d'ARN du réplicon Rep-PI-Luc et 3 µg de plasmide pcDNA IDO ou pcDNA 3.1 (vecteur contrôle vide) ont été électroporés simultanément dans les cellules Huh7.5.1.



Rep-PI-Luc

Figure 22 : Représentation schématique du réplicon Rep-PI-Luc.
PI : IRES du poliovirus ; EI : IRES du virus de l'encéphalomyocardite.

III. Analyses en RT-PCR quantitative

L'ARN intracellulaire a été extrait en utilisant le kit RNeasy® (Qiagen™) selon les recommandations du fournisseur. Une première étape de transcription inverse a été réalisée grâce au *Maxima First Strand cDNA Synthesis kit* (Fermentas/ Thermo Fischer Scientific™, Waltham, MA). L'ADNc des gènes d'intérêts a été amplifié par PCR quantitative en utilisant la technologie des sondes d'hydrolyses TaqMan. Les conditions d'amplifications étaient de 5 minutes à 95°C suivies de 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C sur un

thermocycleur Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science™/ Qiagen™). L'ensemble des amorces et sondes spécifiques des gènes *IDO-1*, *IDO-2*, *IP-10*, *STAT-1* (*Signal transducer and activator of transcription 1*), *IRF-1* (*Interferon-regulatory factor 1*), *MDA5* (*Melanoma differentiation-associated protein 5*), *PKR* (*Protein kinase R*), *Claudine-1* (CLDN-1), *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-λ*, et GAPDH (*glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase*) ont été obtenus auprès de Applied Biosystems™/Life Technologies™. La GAPDH a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation des RT-PCR quantitatives.

IV. Western Blotting

1. Anticorps utilisés

L'anticorps polyclonal anti-IDO-1 et les anticorps anti-IRF-1 et anti-β-actine ont été obtenus respectivement auprès de Abcam™ (Cambridge, RU), Santa Cruz Biotechnology™ (Santa Cruz, CA) et Sigma-Aldrich™ (Saint-Louis, MO). Les anticorps anti-STAT-1 et anti-phospho-STAT-1 (Tyr701) ont été obtenus auprès de Cell Signaling™ (Beverly, MA). Les anticorps secondaires anti-IgG de lapin et anti-IgG de souris couplés à la peroxydase de raifort ont été obtenus auprès de Thermo Fischer Scientific™.

2. Etapes du Western Blotting

Les protéines soumises à électrophorèse (5-10 µg) ont été dénaturées dans du tampon Laemmli (Biorad™, Hercules, CA) en présence de 5 % de β-mercaptoéthanol pendant 5 minutes à 95°C, déposées sur un gel SDS-PAGE 10 % puis transférées sur une membrane PVDF (Amersham Biosciences™, Chalfont St. Giles, UK). Les membranes ont été saturées dans une solution de tampon phosphate salin contenant 0,1 % de Tween-20 (tampon PBS-T) et 5 % de lait pendant 1 heure puis incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dans du tampon PBS-T avec 5 % lait pendant 2 heures ou une nuit. Après 3 lavages par du tampon PBS-T sous agitation, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort dans du PBS-T avec 5 % de lait pendant 1 heure puis lavées au PBS-T. Les complexes protéines-anticorps spécifiques ont été révélés par chimiluminescence grâce au kit Amersham™ ECL™ Prime (Amersham Biosciences™). Alternativement, les complexes protéines-anticorps ont été révélés par l'ECF Western Blotting reagent (Amersham Biosciences™) et visualisés sur Typhoon™ Trio (GE Healthcare™, Little Chalfont, RU). La densité des bandes a été quantifiée grâce au logiciel ImageQuant (GE Healthcare™).

V. Analyse de l'activité enzymatique de IDO

1. Mesure de l'activité enzymatique de IDO

L'activité enzymatique de IDO a été évaluée par sa capacité à cataboliser le L-Tryptophane (L-Try) d'origine exogène (Sigma Aldrich®) en L-Kynurénine (L-Kyn). Pour cela, les cellules Huh7.5.1 et/ou les HPH exprimant IDO (après stimulation ou après transfection) ont été lavées soigneusement au PBS et incubées dans une solution saline HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco®) contenant 100 µM de L-Try (Sigma Aldrich®) à 37°C sous 5 % de CO_2. Après 4 heures, le surnageant a été recueilli et centrifugé. Les concentrations de L-Try et L-Kyn dans le surnageant ont été déterminées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Laich et al., 2002) en collaboration avec le Pr. Dietmar Fuchs (Institute for Medical Chemistry and Biochemistry, Leopold Franzens University, A-6020 Innsbruck, Autriche). Alternativement, les concentrations de Kyn dans le surnageant ont été déterminées par spectrophotométrie après une réaction de Ehrlich (Däubener et al., 1994). Pour réaliser cette réaction, 10 µl d'une solution d'acide trichloracétique 30 % ont été ajoutés à 160 µl du surnageant afin de stopper la réaction de transformation du L-Try en N-formylkynurénine. Le mélange a ensuite été incubé à 50°C pendant 30 minutes pour permettre l'hydrolyse de la N-formylkynurénine en L-Kyn. Après centrifugation 100 µl du mélange réactionnel ont été ajoutés à 100 µl d'une solution à 1,2 % de 4-(diméthylamino) benzaldhéhyde (Sigma Aldrich®) dissous dans de l'acide acétique glacial, ce qui produisait une réaction colorée jaune en présence de L-Kyn. L'absorbance du mélange a été mesurée à 490 nm. Les valeurs de densité optique ont été rapportées à une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues de L-Kyn (0 – 100 µM, Sigma-Aldrich™)

2. Blocage de l'activité enzymatique de IDO et mesure de la viabilité cellulaire

Le 1-méthyl-DL-tryptophane (1-DL-MT, Sigma-Aldrich™) est un mélange racémique des énantiomères dextrogyres et lévogyres de 1-méthyl-tryptophane. La toxicité cellulaire du 1-DL-MT aux concentrations utilisées à été vérifiée par un test MTT (*3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). Pour cela, les cellules ont été incubées en présence d'une solution HBSS (Gibco™) contenant du L-Try (100 µM) et du 1-DL-MT à différentes concentrations pendant 4 heures puis un réactif MTT (Promega™, Madison, WI) a été ajouté au mélange réactionnel (concentration finale = 0,83 mg/ml). Après 5 heures d'incubation à 37°C, le surnageant a été retiré et les cristaux de formazan qui s'étaient formés ont été dissous dans une solution d'isopropanol contenant 0,04 M de HCl.

L'absorbance de la réaction colorée obtenue a été mesurée par spectrophotométrie à 550/690 nm sur un lecteur Mithras LB 940 (Berthold Technologies™).

La nécrostatine-1 a été obtenue auprès de Cayman Chemical™ (Ann Arbor, MI) et solubilisée dans du DMSO pour obtenir une concentration de 40 mM. La toxicité du DMSO pour les cellules Huh7.5.1 a été vérifiée en mesurant la capacité des cellules Huh7.5.1 surexprimant IDO (pcDNA IDO) à transformer normalement le L-Try en L-Kyn lorsqu'elles étaient incubées avec différentes concentrations de DMSO. Aux concentrations utilisées lors des expériences de blocage enzymatique de IDO, aucune toxicité cellulaire liée au DMSO n'a été constatée.

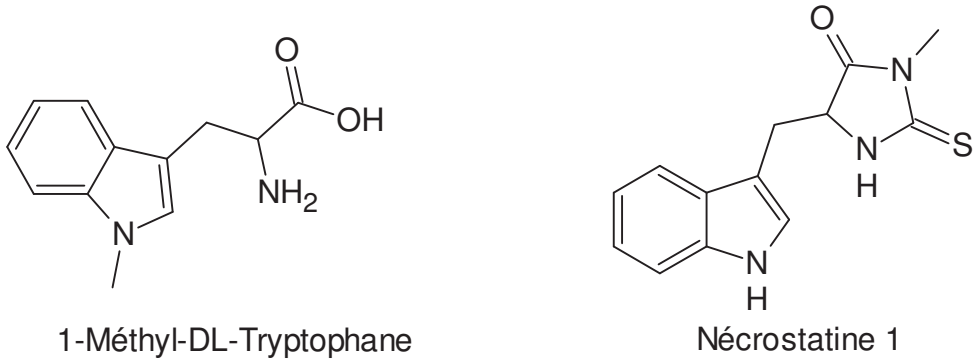


Figure 23 : Représentations chimiques du 1-méthyl-tryptophane et de la nécrostatine.
Les deux molécules contiennent un noyau indole. Le 1-MT diffère du tryptophane par la présence d'un groupement méthyl (CH3) en position 1 de son noyau indole. Représentations réalisées à l'aide du logiciel ChemSketch.

VI. Transfection de plasmides et interférence ARN

Expériences de transfection de plasmides

Les HPH et/ou les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec un plasmide pcDNA IDO codant pour la protéine humaine IDO-1 et gracieusement fourni par le Dr. S Thomas (Centre for Vascular Research, University of New South Wales, Sydney, Australie), un plasmide pcDNA IRF-1 (Invivogene™, San Diego, CA), ou avec le vecteur d'expression d'origine pcDNA 3.1 vide utilisé comme contrôle (Invitrogen™). Les transfections dans les cellules Huh7.5.1 et dans les HPH ont été réalisées respectivement avec la Lipofectamine® 2000 (Invitrogen™) et la Lipofectamine® LTX (Invitrogen™) selon le protocole du fournisseur.

Expériences de silencing de IRF-1

Le *silencing* de IRF-1 a été réalisé en utilisant un pool de 4 siARN dirigés contre IRF-1 (SMARTpool) obtenu auprès de Dharmacon Research™ (Lafayette, CO). Un siARN contrôle

(siGLO, Dharmacon Research™) n'entrainant pas l'activation du complexe RISC a été utilisé en parallèle pour s'assurer de la spécificité des effets cellulaires observés. Les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec les siRNA IRF-1 ou avec le siRNA GLO (50 nM) en utilisant le DharmaFECT 4 Transfection Reagent (Dharmacon Research™) selon les recommandations du fabricant. Après 48h, les cellules ont été stimulées par l'IFN-γ (50 UI/ml) pendant 7 heures puis lysées pour quantifier l'expression intracellulaire de IRF-1 et de IDO.

Expériences de silencing de IDO

Les expériences de *silencing* de IDO ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Qisheng Li et le Dr. T. Jake Liang (Liver Diseases Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH, Bethesda, MD). Les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec des siARN dirigés contre IDO-1, contre la chaine IFNAR2 du récepteur de l'IFN-α, ou avec un siARN contrôle à la concentration finale de 50 nM en utilisant de l'Oligofectamine® (Invitrogen™) comme précédemment décrit (Li et al., 2013). Après 72h, les cellules ont été infectées avec des VHCcc (JFH1). Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules ont été traitées avec de l'IFN-α à 10 UI/ml ou laissées non-traitées. Au bout de 48h, l'ARN intracellulaire a été extrait en utilisant le RNeasy® Mini kit (Qiagen™). L'expression des ARNm de IDO-1 a été quantifiée par PCR quantitative sur thermocycleur ABI 7500 (Applied Biosystems™) après une étape initiale de transcription inverse par le First Strand cDNA Synthesis kit (Roche™). Les quantités relatives de IDO-1 ont été calculées par la méthode des ΔΔCt en étant normalisées sur les quantités d'ARNr 18S (Applied Biosystems™). Le nombre de copies intracellulaires de JFH1 a été mesuré par RT-PCR et normalisées sur l'ARNr 18S.

VII. Cytométrie de flux

1. Expression des antigènes de surface et des antigènes intracellulaires par cytométrie de flux

L'expression des antigènes $CD4^+$ et celle des chaines α des récepteurs à l'IFN-γ (IFN-γR) ont été déterminées respectivement par marquage avec un anticorps anti-$CD4^+$ couplé à l'Alexa 700 (BD Biosciences™, San Jose, CA) et avec un anticorps anti-récepteur de l'IFN-γ (IFN-γR) couplé à la phycoérythrine (BD Biosciences™) pendant 30 à 45 minutes à 4°C. Les cellules marquées ont ensuite été lavées au PBS, fixées au paraformaldéhyde 2 % puis analysées par cytométrie du flux sur un cytomètre BD™ LSR II en utilisant le logiciel FACSDIVA™ (BD Biosciences™).

L'expression des antigènes intracellulaires VHC Core et IRF-1 a été mesurée après fixation et perméabilisation des cellules grâce au kit BD Cytofix/cytoperm™ (BD Biosciences™). Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-VHC Core (clone C7-50, Thermo Scientific™) ou avec l'anticorps primaire anti-IRF1 (Santa Cruz Biotechnology™) pendant 45 minutes, puis incubées avec un anticorps secondaire marqué par un fluorochrome (respectivement Alexa 555 et PE) pendant 30 minutes. Elles ont été analysées par cytométrie de flux sur BD™ LSR II.

2. Activation de la prolifération des lymphocytes T CD4$^+$

Des lymphocytes T CD4$^+$ isolés à partir de cellules mononucléées sanguines de donneurs sains ont été marqués par du *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) à 10 µM (CellTrace™ CFSE, Life Technologies™). Le CFSE diffuse passivement à l'intérieur des cellules où son groupement diacétate est clivé par des estérases cellulaires pour donner un composé hautement fluorescent. Lorsque la cellule se divise, le CFSE est partagé en quantités égales entre les cellules filles. Le marquage au CFSE permet donc de suivre les divisions cellulaires successives d'une population parentale. L'intensité d'expression du CFSE diminue à chaque nouvelle génération de cellules filles (Lyons, 2000). La prolifération des lymphocytes T CD4$^+$ a été induite par contact avec des billes magnétiques porteuses d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Dynabeads™ Human T-activator CD3/CD28, Life Technologies™) en présence d'interleukine 2 (30 UI/mL, Invitrogen™) conformément au protocole du fournisseur. La prolifération des lymphocytes T CD4$^+$ a été analysée en mesurant l'expression du CFSE par cytométrie de flux (canal FITC). Le pourcentage de cellules filles résultant des divisions cellulaires successives a été calculé en utilisant le logiciel ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME). L'index de prolifération (IP) a été calculé par le programme ModFit et représente la somme des cellules de chaque génération divisée par le nombre de cellules parentales au début de l'expérience estimé par le logiciel. L'IP est proportionnel au pourcentage de cellules qui sont entrées en prolifération et est pondéré par le nombre de divisions cellulaires subies par les cellules.

3. Expériences de co-culture cellulaire

Les lymphocytes T CD4$^+$ isolés à partir de PBMCs de donneurs sains ont été marqués au CFSE et stimulés avec des billes porteuses d'anticorps anti-CD3/CD28 en présence d'IL-2 comme décrits ci-dessus. Le même jour, les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec le plasmide pcDNA IDO ou le plasmide contrôle pcDNA 3.1. Après 48h, les lymphocytes T CD4$^+$ activés

ont été ajoutés aux cellules Huh7.5.1 avec un ratio de 1 : 1. Le milieu de culture était composé de 50 % de milieu de culture RPMI utilisé pour les lymphocytes T $CD4^+$ (avec supplémentations) et de 50 % de milieu DMEM utilisé pour les cellules Huh7.5.1 (avec supplémentations). Après 72 h, les lymphocytes T $CD4^+$ ont été recueillis et leur prolifération a été analysée en cytométrie de flux comme décrit précédemment (Figure 24).

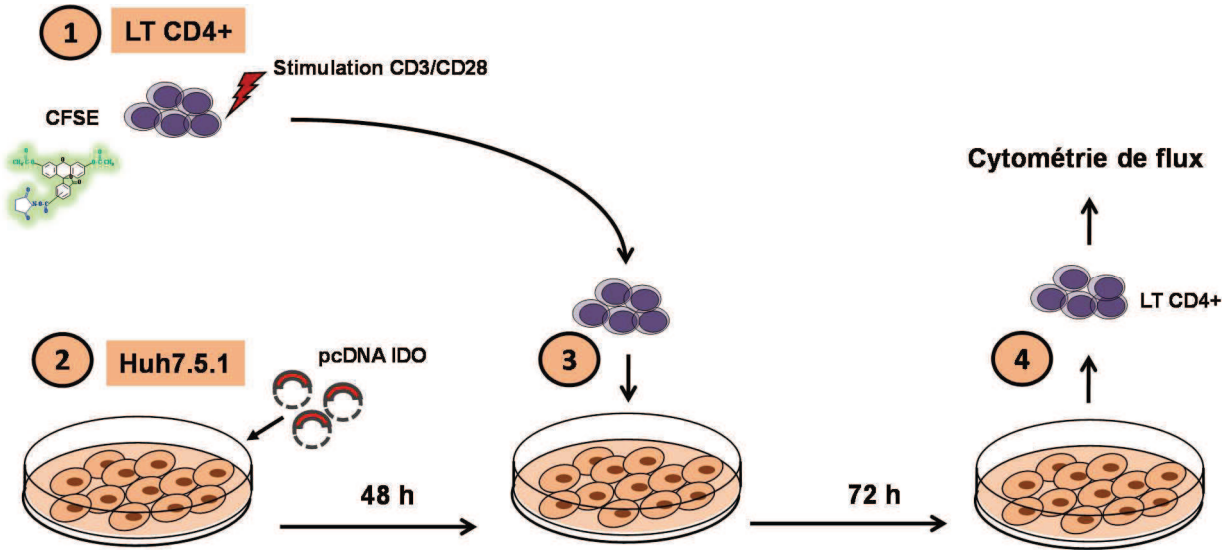


Figure 24 : Etapes de la co-culture des lymphocytes T $CD4^+$ et des cellules Huh7.5.1.

Les lymphocytes T $CD4^+$ ont été marqués au CFSE et stimulés par des anticorps anti-CD3/CD28 (1). Les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec le plasmide pcDNA IDO ou avec le plasmide contrôle pcDNA 3.1. (2). Après 48h, les cellules ont été mises en co-culture (3). Après 72h, la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ a été évaluée par cytométrie de flux.

VIII. Analyses statistiques

Les comparaisons statistiques ont été réalisées par test T de Student. Les données ont été exprimées en moyennes ± écart-types. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

RESULTATS

I. Les hépatocytes primaires humains expriment IDO-1

Les hépatocytes sont les cellules cibles du VHC. Ils sont également la première ligne de défense contre le VHC grâce à leur capacité de détection du virus et de déclenchement de la réponse immunitaire innée. Nous avons voulu déterminer si les hépatocytes humains expriment IDO-1 lorsqu'ils sont stimulés par l'IFN-γ et/ou par l'IFN-α. Pour cela, des hépatocytes primaires humains (HPH) provenant de deux donneurs distincts (H1421 et H1423) ont été incubés avec de l'IFN-γ ou -α à des concentrations comprises entre 1 UI/ml et 1000 UI/ml. L'efficacité de la stimulation par les IFN-γ et -α a été vérifiée au cours d'une expérience préliminaire en mesurant l'expression des ARNm de IP-10 et de la 2'-5' oligoadénylate synthase (OAS), deux protéines dont l'expression est respectivement stimulée par les IFN-γ et -α (Liu et al., 2011; Yan et al., 1989) (Figures 25A et B). L'expression des ARNm codant pour IDO-1 a été déterminée par RT-PCR quantitative.

L'IFN-γ stimulait l'expression de IDO-1 dans les HPH de manière dose-dépendante pour atteindre un plateau à la concentration de 100 UI/ml. L'expression des ARNm de IDO-1 dans les cellules stimulées par l'IFN-γ était alors 40 à 50 fois supérieure à celle observée dans les cellules non stimulées (Figure 25A). De la même manière, l'IFN-α stimulait l'expression de IDO-1 dans les HPH. Les concentrations d'IFN-α nécessaires pour stimuler IDO-1 étaient cependant plus élevées qu'avec l'IFN-γ (Figure 25B). L'expression de la protéine IDO-1 dans les HPH stimulés par l'IFN-γ a été vérifiée par Western Blotting. En présence d'IFN-γ à la concentration 100 UI/ml, l'expression de IDO-1 dans les HPH était détectable dès 24h post-stimulation puis augmentait à 48h et 72h post-stimulation (Figure 25C). L'ensemble de ces résultats indique que les hépatocytes humains expriment IDO-1 lorsqu'ils sont stimulés par l'IFN-γ et à un moindre degré par l'IFN-α.

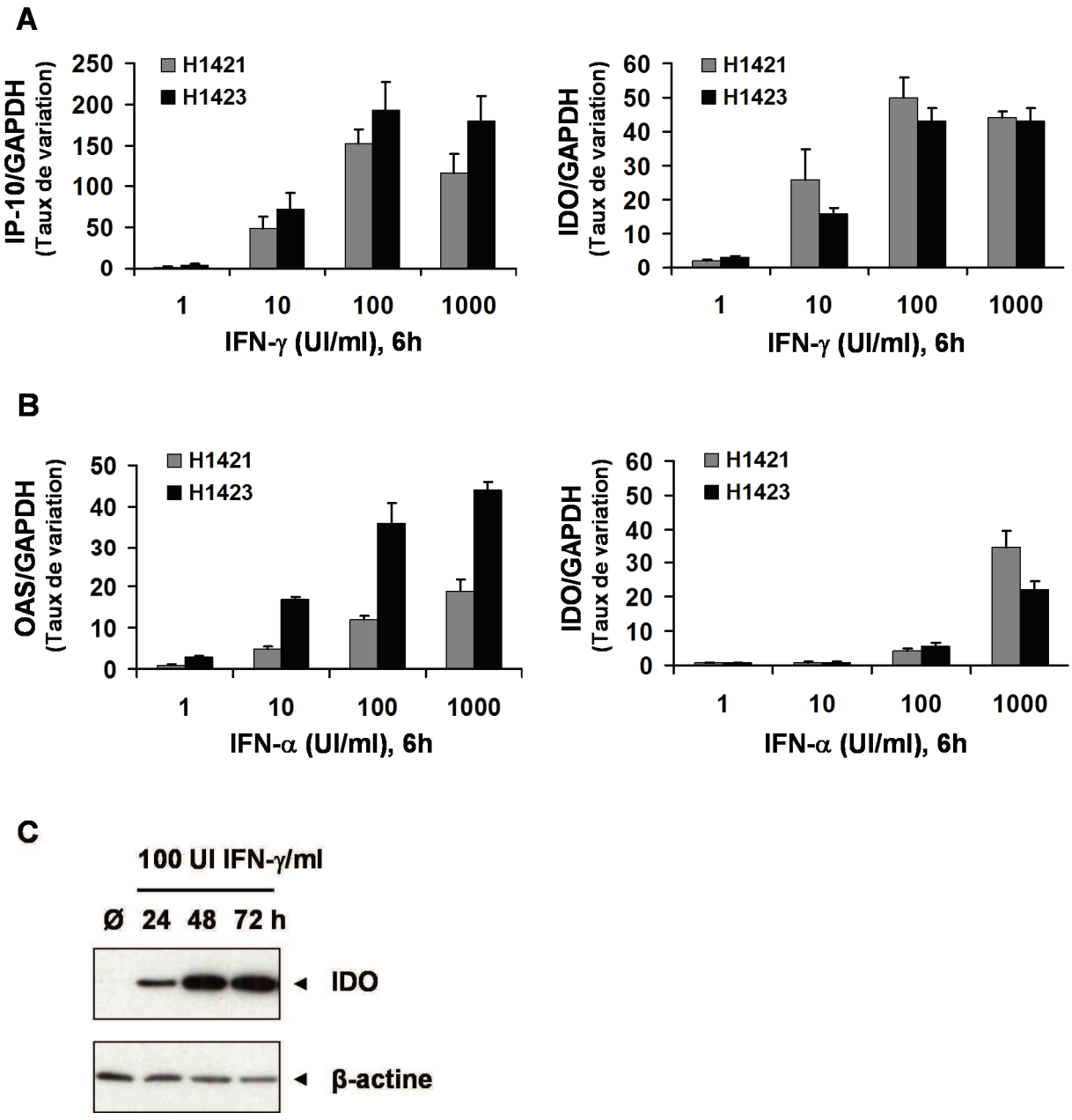


Figure 25 : Expression de IDO-1 dans les HPH.

(A) *les HPH provenant de deux donneurs (H1421, H1423) ont été incubés avec différentes doses d'IFN-γ. L'expression cellulaire des ARNm de IDO-1, de IP-10 et de la GAPDH ont été déterminés par RT-PCR quantitative. L'expression de IDO-1 mentionnée correspond à la variation du ratio IDO-1/GAPDH entre les cellules stimulées par l'IFN-γ et les cellules non stimulées (Taux de variation).* ***(B)*** *les HPH ont été incubés avec différentes doses d'IFN-α. L'expression cellulaire des ARNm de IDO-1, de l'OAS et de la GAPDH a été déterminée par RT-PCR quantitative.* ***(C)*** *Les HPH ont été incubés avec l'IFN-γ puis recueillis aux temps indiqués. Le niveau d'expression de la protéine IDO-1 dans les lysats cellulaires a été déterminé par Western Blotting. OAS : 2'-5' oligoadénylate synthase.*

II. IDO-1 est fonctionnellement active dans les hépatocytes primaires humains

Dans certaines circonstances, IDO-1 peut être exprimée sans être fonctionnellement active (Mellor and Munn, 2004), probablement suite à des modifications post-transcriptionnelles de la protéine (Fujigaki et al., 2006b, 2012). Afin de déterminer si la protéine IDO-1 exprimée par les hépatocytes est fonctionnellement active, nous avons incubé les HPH avec le substrat préférentiel de IDO-1, le L-Tryptophane, et nous avons stimulé l'expression de IDO-1 par l'ajout d'IFN-γ. La dégradation du L-Tryptophane (L-Try) et l'accumulation de L-Kynurénine (L-Kyn) dans le surnageant de culture ont été mesurées par HPLC. Sous l'effet de la stimulation des HPH par l'IFN-γ, nous avons observé une élévation de la concentration en L-Kyn (Figure 26A) dans le milieu de culture et une augmentation du ratio des concentrations L-Kyn/L-Try (Figure 26B). Ce résultat indique que le L-Try initialement présent dans le milieu de culture a été catabolisé via la voie des kynurénines.

Trois enzymes peuvent catalyser la transformation du L-Try en L-Kyn : les 2 isoformes IDO-1 (inductible par l'IFN-γ) et IDO-2 et la TDO (exprimée constitutivement dans le foie). Pour démontrer que IDO (isoforme 1 et/ou 2) est la principale enzyme impliquée dans le catabolisme du L-Try dans notre modèle et pour exclure la participation de TDO, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de IDO, le 1-méthyl-DL-tryptophane (1-DL-MT). Lorsque les HPH étaient stimulés par l'IFN-γ en présence de 1-DL-MT, la production de L-Kyn et l'élévation du ratio L-Kyn/L-Try étaient abolies (Figures 26A et B), ce qui indique que IDO est la principale enzyme responsable de la dégradation du L-Try dans les HPH stimulés. L'ensemble de ces résultats indique que la protéine IDO produite par les HPH stimulés est fonctionnellement active, responsable de la dégradation du L-Try en L-Kyn dans le microenvironnement.

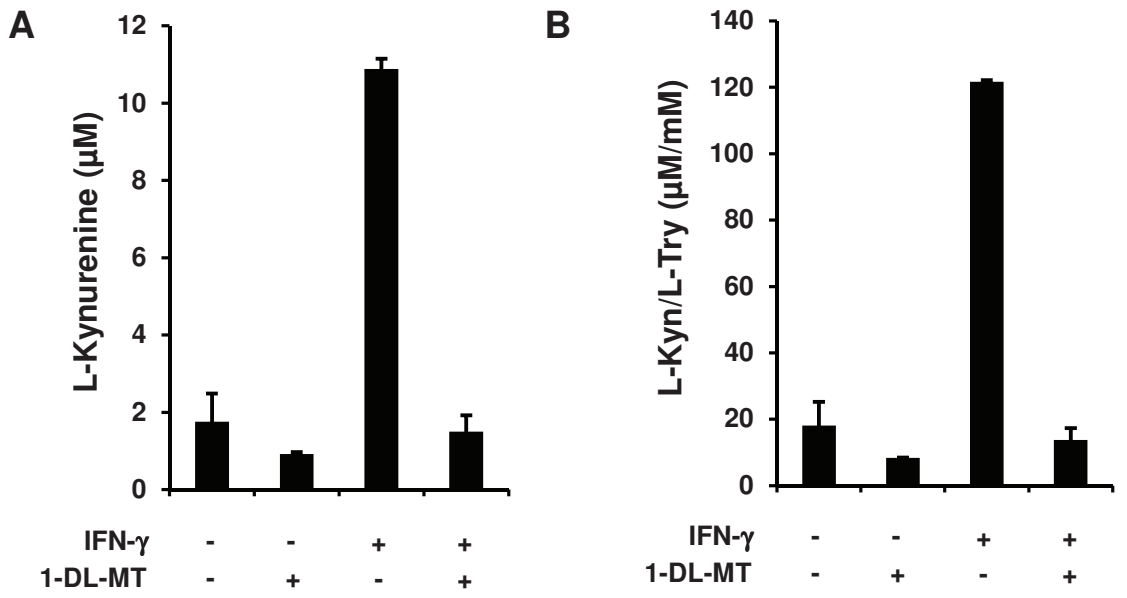


Figure 26 : Activité enzymatique de IDO dans les HPH.

*Les HPH ont été stimulés avec de l'IFN-γ (100 UI/ml) pendant 48 heures en présence ou en absence de 1-DL-MT (100 µM). Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 4 heures dans une solution HBSS contenant 100 µM de L-Try. Les concentrations en L- Kyn **(A)** et en L-Try ont été mesurées dans le surnageant de culture par HPLC. Le ratio des concentrations L-Kyn / L-Try a été calculé **(B).** Les résultats représentent les moyennes ± DS des concentrations mesurées au cours de deux expériences indépendantes.*

III. Le VHC stimule l'expression de IDO-1 dans les hépatocytes

Pour déterminer l'impact de l'infection par le VHC sur l'expression hépatique de IDO, nous avons infecté des HPH avec des particules virales de VHC de variant JFH1 (génotype 2a) produites en culture cellulaires (VHCcc) (Wakita, 2005). Avec ce modèle, nous avons observé une réplication du JFH1 dans les HPH, détectable par RT-PCR quantitative. Cependant, la réplication du JFH1 dans les HPH était transitoire, avec un pic de réplication survenant à 48h post-infection (Figure 27A). L'observation d'une réplication limitée du VHC dans les HPH est en accord avec les résultats décrits précédemment par d'autres équipes (Thomas et al, 2012) et suggère que des mécanismes de défense innée sont rapidement activés au sein des hépatocytes infectés et restreignent la réplication virale.

Afin de déterminer si la réplication du VHC stimule l'expression de IDO dans les hépatocytes, nous avons mesuré l'expression des ARNm de IDO-1 et de IDO-2 dans les HPH infectés par RT-PCR quantitative. L'expression des transcrits ARNm de IDO-1 était augmentée dans les HPH infectés par le JFH1 avec un pic d'expression à 48h coïncidant avec la réplication du virus. A l'inverse, l'expression des transcrits de IDO-1 ne variait pas lorsque les cellules

étaient incubées avec un virus préalablement inactivé par les UV (Figure 27B). A la différence de IDO-1, l'expression de IDO-2 dans les HPH n'était pas modifiée au cours de l'infection par le JFH1 (Figure 27C). Ces résultats indiquent que la réplication du VHC stimule l'expression de IDO-1 dans les hépatocytes primaires humains mais ne modifie pas l'expression de IDO-2.

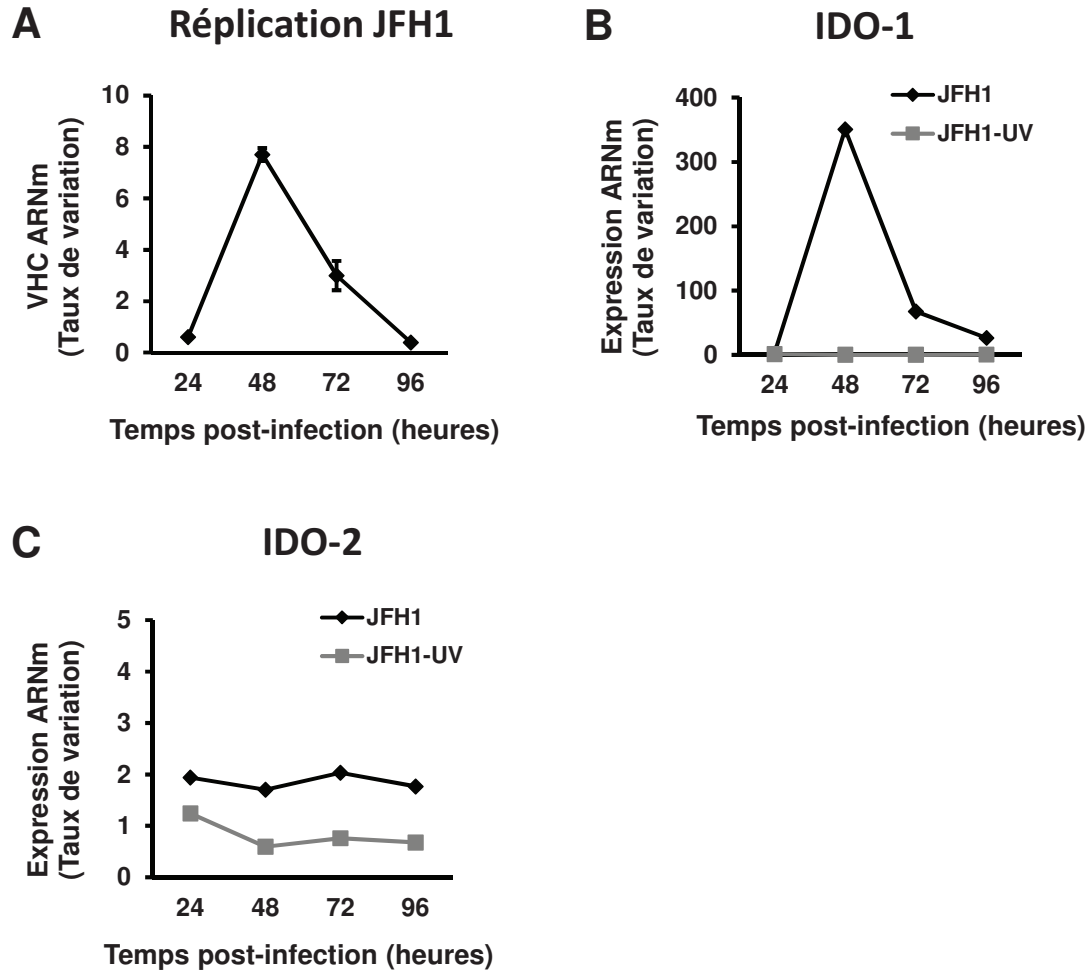


Figure 27 : Le VHC stimule l'expression de IDO-1 dans les hépatocytes.

Les HPH (donneur H0199) ont été infectés avec des VHCcc du variant JFH1 pendant 3h, lavés puis lysés aux temps indiqués. L'expression des ARNm a été quantifiée par RT-PCR et normalisée sur l'expression de la GAPDH. ***(A) Réplication du JFH1.*** *L'expression du JFH-1 mentionnée sur la figure correspond à la variation du ratio JFH1/GAPDH entre le temps initial (3h post-infection) et les temps indiqués (Taux de variation).* ***(B) Expression de IDO-1 et (C) de IDO-2.*** *L'expression des gènes d'intérêt (IDO-1 ou -2) mentionnée correspond à la variation du ratio Gène d'intérêt/GAPDH entre le temps initial (3h post-infection) et les temps indiqués (Taux de variation) dans les cellules exposées à du JFH1 infectieux ou à du JFH1 préalablement inactivé par les UV (JFH1-UV).*

IV. Le VHC stimule l'expression des interférons et de gènes stimulés par les interférons dans les hépatocytes

Afin de déterminer si l'activation de IDO-1 dans les hépatocytes infectés par le VHC est contemporaine du déclenchement de la réponse immunitaire innée, nous avons quantifié l'expression des gènes codant pour les IFNs de type I et III et de certains gènes stimulés par les interférons (ISGs) dans les HPH infectés par le JFH1.
L'infection des HPH par le JFH1 activait l'expression des IFN-α, -β et -λ avec un pic d'expression à 48h-72h pour l'IFN-α et à 48h pour les IFN-β et -λ. A l'inverse, l'incubation des HPH avec du virus préalablement inactivé par les UV n'induisait pas l'expression des IFN-α, -β, et –λ (Figure 28A).

Les protéines IP-10 (CXCL10), MDA5, PKR, IRF-1 et STAT-1 sont codées par des ISGs et jouent un rôle clé dans le *sensing* intracellulaire de motifs moléculaires viraux et/ou dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée (Schneider et al., 2014). L'infection des HPH par le JFH1 s'accompagnait d'une surexpression transitoire des transcrits codants pour IP-10, MDA5, PKR, IRF-1 et STAT-1, avec un pic d'expression à 48h contemporain du pic de réplication du JFH1. A l'inverse, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de ces transcrits dans les cellules incubées avec des particules virales inactivées par les UV, ce qui indique que la surexpression de ces gènes est directement liée à la réplication du VHC (Figure 28B).

La surexpression des IFNs et des ISGs observée dans les HPH infectés suggère une activation des défenses immunitaires de la cellule en réponse à l'infection. Afin de confirmer cette hypothèse et d'exclure une éventuelle augmentation aspécifique de ces protéines cellulaires (liée par exemple à une altération métabolique dans les cellules infectées), nous avons mesuré l'expression des transcrits codant pour la claudine-1 (CLDN-1), une protéine membranaire dont l'expression n'est pas influencée par la voie des IFNs et par le déclenchement de la réponse immunitaire (Evans et al., 2007). Comme supposé, l'expression des transcrits codant pour la CLDN-1 dans les HPH n'était pas modifiée au cours de l'infection par le VHC (Figure 28B). L'ensemble de ces résultats indique que le VHC active les IFN-α, -β et -λ dans les HPH, ainsi que certains ISGs tels que IP-10, MDA5, PKR, IRF-1 et STAT-1. L'expression des IFNs et des ISGs est contemporaine de l'expression de IDO-1 dans les HPH infectés par le VHC, ce qui suggère que IDO pourrait appartenir aux mécanismes de défense de la cellule contre le virus.

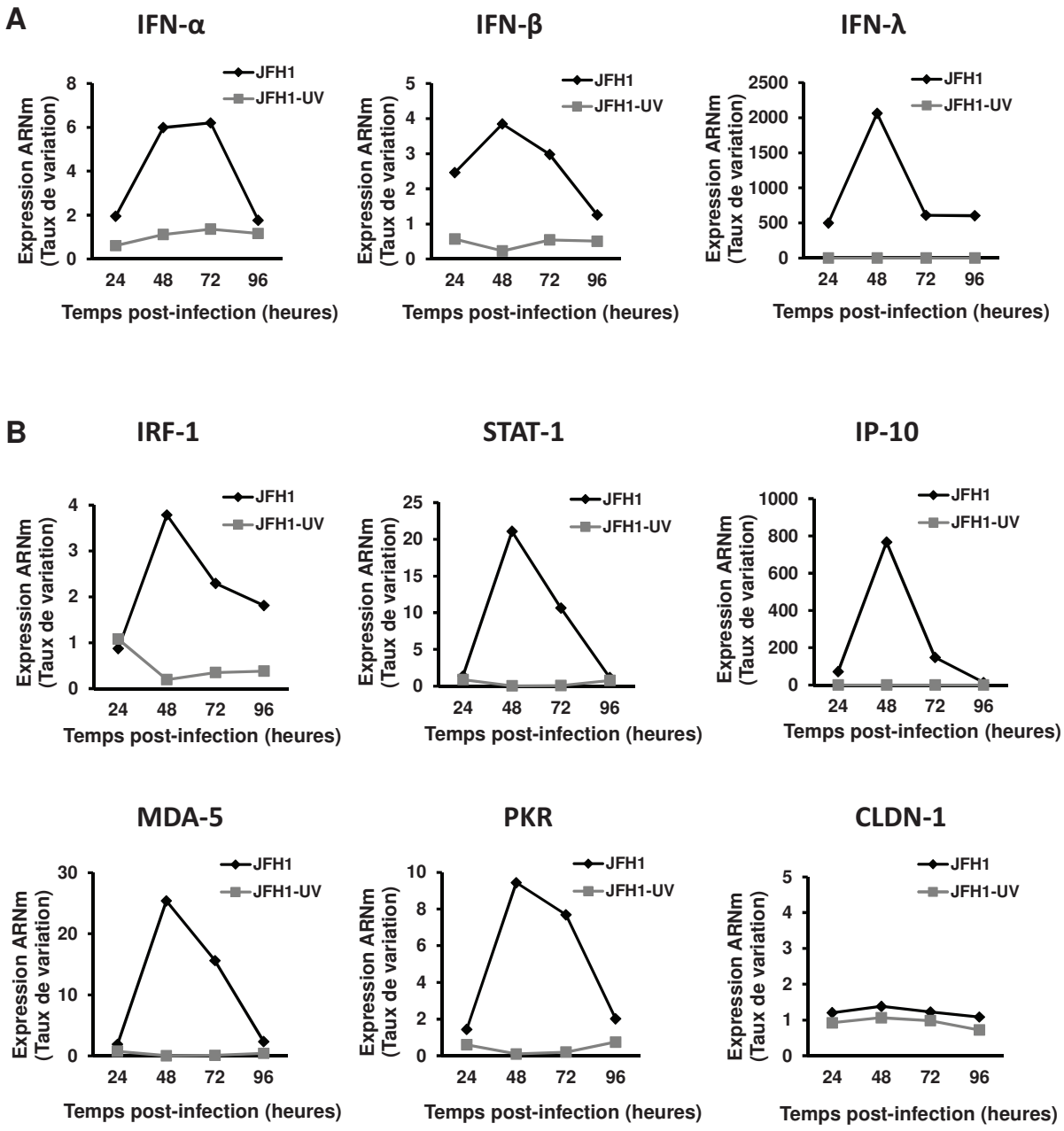


Figure 28 : Expression des IFNs et des gènes stimulés par les IFNs dans les hépatocytes infectés. *Les HPH ont été infectés avec le JFH1 pendant 3h, lavés puis lysés aux temps indiqués. L'expression des ARNm a été quantifiée par RT-PCR et normalisée sur l'expression de la GAPDH. L'expression des gènes d'intérêt mentionnée sur la figure correspond à la variation du ratio Gène d'intérêt/GAPDH entre le temps initial (3h post-infection) et les temps indiqués (Taux de variation) dans les cellules exposées au JFH1 infectieux ou au JFH1 inactivé par les UV (JFH1-UV).* ***(A)*** *Expression des IFN-α, -β et -λ.* ***(B)*** *Expression des gènes stimulés par les IFNs IRF-1, STAT-1, IP-10 (CXCL10), MDA-5 et PKR, et expression du gène de la Claudine 1 (CLDN-1).*

V. Le VHC stimule l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1

Puisque la réplication du JFH1 dans les HPH était limitée et transitoire et compte-tenu des contraintes liées à l'utilisation de ce modèle cellulaire, nous avons utilisé le modèle des cellules de la lignée Huh7.5.1 qui permet d'obtenir une réplication robuste du JFH1 (Wakita, 2005).

Afin de s'assurer que les cellules Huh7.5.1 utilisées supportent bien la réplication du JFH1, nous avons exposé ces cellules au JFH1 puis nous avons mesuré l'expression de la protéine Core du VHC par cytométrie de flux. Comme indiqué sur la Figure 29A, l'expression de la protéine Core était détectable dans la majorité des cellules Huh7.5.1 au 5ème jour après l'infection, ce qui témoigne de l'efficacité de la réplication du JFH1 dans ce modèle cellulaire.

Afin de déterminer si l'infection par le VHC active l'expression de IDO-1 dans les Huh7.5.1, nous avons comparé l'expression des transcrits ARNm de IDO-1 dans les Huh7.5.1 non-infectées et infectées. L'expression des transcrits de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1 non-infectées par le JFH1 était très faible voire indétectable mais elle augmentait significativement lorsque les cellules Huh7.5.1 étaient infectées par le JFH1 (Figure 29B). Ce résultat indique que le VHC active l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1.

De manière intéressante, l'expression de IDO-1 était significativement augmentée lorsque les cellules Huh7.5.1 étaient à la fois incubées en présence du JFH1 et de l'IFN-γ en comparaison des cellules incubées uniquement avec le JFH1 ou avec l'IFN-γ, suggérant un effet cumulatif ou synergique du VHC et de l'IFN-γ sur l'expression de IDO-1 (Figure 29B). Une hypothèse alternative pouvant expliquer ce dernier résultat serait une augmentation de la densité des récepteurs de l'IFN-γ à la surface des cellules Huh7.5.1 infectées, conduisant à un signal de transduction plus intense et à une plus grande stimulation de *IDO-1* (Krakauer and Oppenheim, 1993; Shirey et al., 2006b). Pour exclure cette hypothèse, nous avons quantifié l'expression des chaines α des récepteurs de l'IFN-γ à la surface des cellules Huh7.5.1 par cytométrie de flux. Comme supposé, l'expression des chaines α des récepteurs à l'IFN-γ ne variait pas entre les cellules Huh7.5.1 infectées et non infectées (Figure 29C).

L'ensemble de ces résultats indique que l'infection par le VHC, seule ou en association avec l'IFN-γ, induit l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1.

Il est important de préciser que nous n'avons pas réussi à détecter la protéine IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1 par Western Blotting, probablement parce que l'expression de la protéine IDO-1 dans ces cellules reste faible. En faveur de cette hypothèse, nous avons constaté que l'expression des transcrits ARNm de IDO-1 était significativement plus faible dans les cellules Huh7.5.1 que dans les HPH stimulés par l'IFN-γ (Figure 29D).

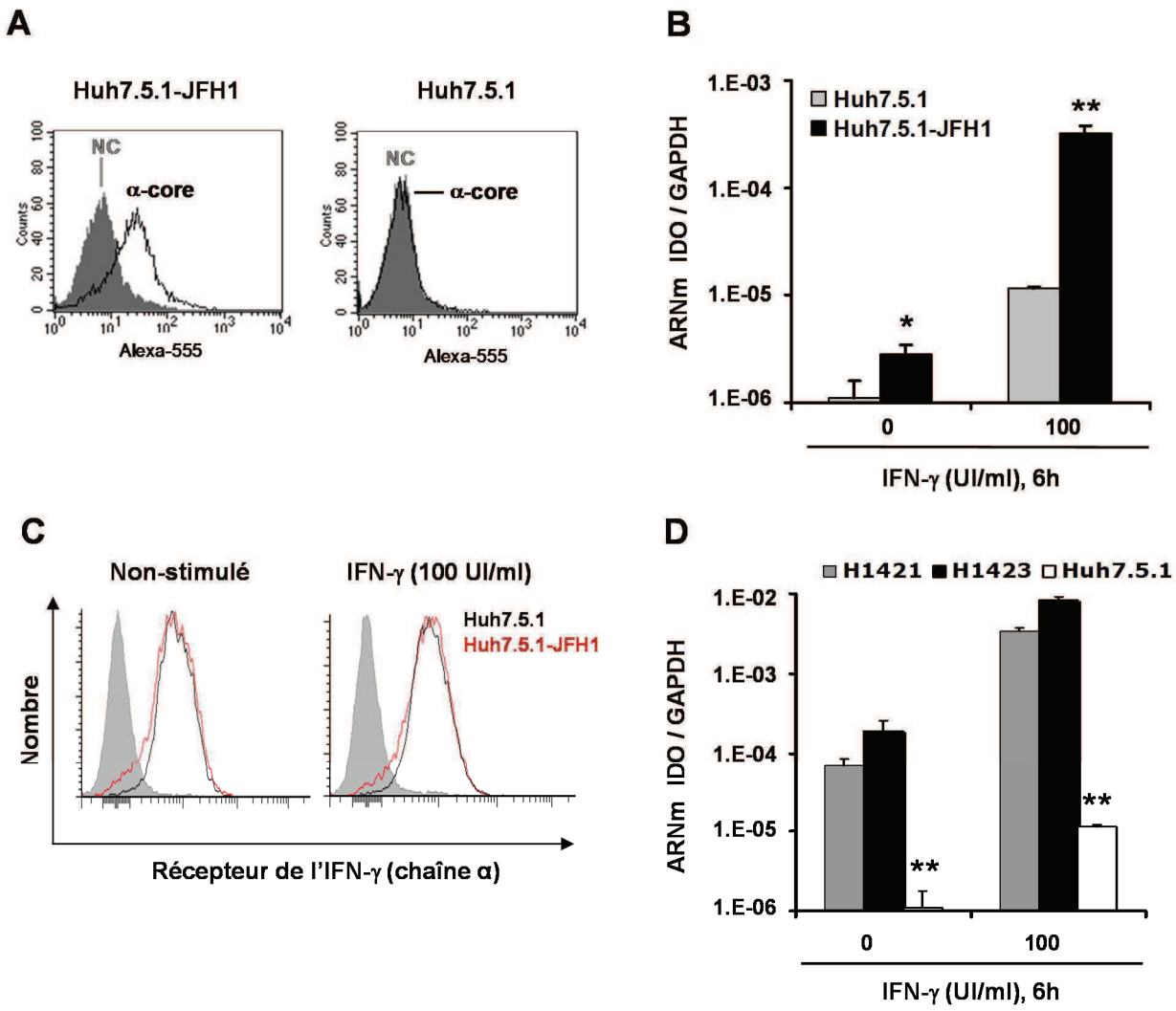


Figure 29 : Le VHC active l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1.

(A) *L'infection des cellules Huh7.5.1 par le VHC a été vérifiée en mesurant l'expression de la protéine Core du VHC par cytométrie de flux au 5ème jour après l'infection.* ***(B)*** *Les cellules Huh7.5.1 infectées et non infectées par le JFH1 ont été stimulées par l'IFN-γ. L'expression des ARNm de IDO-1 a été quantifiée par RT-PCR et normalisée sur l'expression de la GAPDH. Les résultats représentent les moyennes ± DS des valeurs mesurées au cours de trois expériences indépendantes.* ***(C)*** *L'expression des chaînes α des récepteurs de l'IFN-γ a été analysée par cytométrie de flux dans les cellules Huh7.5.1 infectées par le JFH1 avec ou sans stimulation par l'IFN-γ durant 4h.* ***(D)*** *Niveaux d'expression des ARNm de IDO-1 dans les HPH (donneurs H1421 et H1423) et dans les cellules Huh7.5.1 en présence et en absence d'IFN-γ. *p<0,05, **p<0,01.*

VI. L'IFN-γ produit par les lymphocytes T CD4⁺ contribue à l'activation hépatique de IDO-1

L'infection aiguë par le VHC s'accompagne d'un afflux de lymphocytes T CD4⁺ activés dans le foie (Thimme et al., 2012). Nous avons voulu déterminer si la production d'IFN-γ par les lymphocytes T CD4⁺ activés est suffisante pour induire l'expression de IDO-1 dans les hépatocytes situés dans leur environnement. Pour cela, nous avons établi un modèle de co-culture impliquant des cellules Huh7.5.1 et des lymphocytes T CD4⁺ préalablement activés par stimulation des récepteurs CD3 et CD28.

Au cours d'une expérience préliminaire, nous avons quantifié la production d'IFN-γ par les lymphocytes T CD4⁺ non activés et activés grâce à une technique ELISA. Comme supposé, la libération d'IFN-γ par les lymphocytes T CD4⁺ non activés était faible voire indétectable, mais elle augmentait lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Figure 30A).

Comme indiqué sur la Figure 30B, l'expression des ARNm de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1. était significativement augmentée lorsque ces cellules étaient placées au contact de lymphocytes T CD4⁺ activés. Ce résultat suggère que les lymphocytes T CD4⁺ activés présents dans le foie contribuent à l'activation hépatique de IDO-1 via la libération d'IFN-γ.

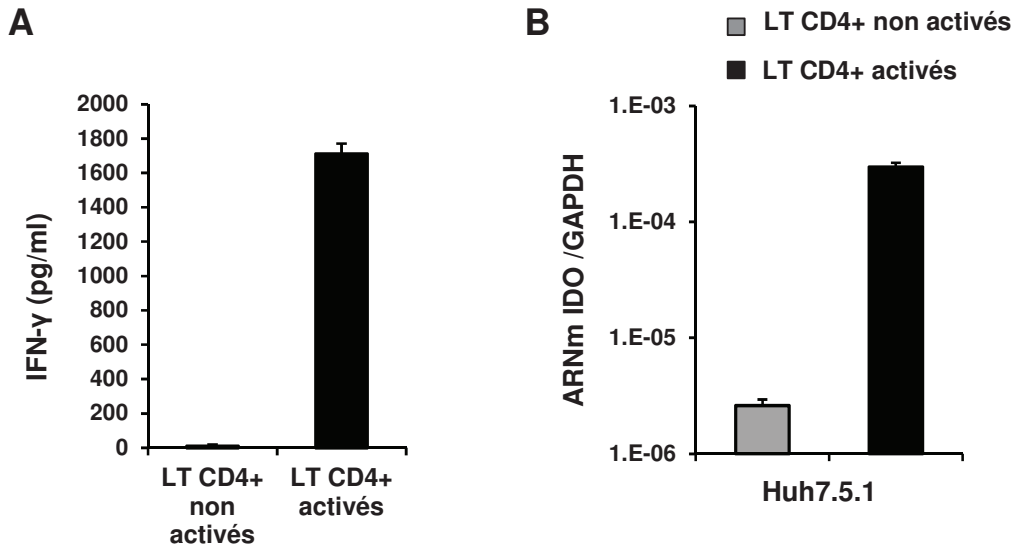


Figure 30 : Les lymphocytes T CD4⁺ activés contribuent à l'induction hépatique de IDO-1.
(A) Des lymphocytes T CD4⁺ ont été activés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-2 (LT CD4⁺ activés) ou laissés au repos (LT CD4⁺ non activés). Après 24h, les lymphocytes T CD4⁺ ont été placés en co-culture avec des cellules Huh7.5.1. Au bout de 72h supplémentaires, la production d'IFN-γ dans le surnageant a été déterminée par ELISA. **(B)** L'expression des ARNm de IDO a été quantifiée par RT-PCR dans les cellules Huh7.5.1 et normalisée sur l'expression de la GAPDH. Les

résultats représentent les moyennes ± DS des valeurs mesurées au cours de trois expériences indépendantes.

VII. La protéine IRF-1 régule l'expression de IDO-1 induite par le VHC

IRF-1 est un facteur de transcription majeur dans la réponse immunitaire antivirale (Schoggins et al., 2011) et joue un rôle central dans l'expression de IDO-1 induite par l'IFN-γ (Pine, 1997). Nous avons donc voulu déterminer le rôle joué par IRF-1 lors de l'expression hépatocytaire de IDO-1 induite par le VHC.

Nous avons précédemment pu établir que l'infection des HPH par le VHC activait l'expression du gène *IRF-1* (Voir ci-dessus). De la même manière, l'infection de cellules Huh7.5.1 avec du JFH1 augmentait significativement l'expression de IRF-1, à la fois en l'absence et en présence d'IFN-γ (Figure 31A). Afin de confirmer cette observation à l'échelle de la protéine, nous avons mesuré l'expression intracellulaire de IRF-1 par cytométrie de flux dans des cellules Huh7.5.1 infectées et non-infectées par le JFH1. Comme indiqué sur la Figure 31B, l'expression de la protéine IRF-1 était augmentée dans les Huh7.5.1 infectées par rapport aux cellules non-infectées. Ces résultats indiquent que l'infection par le VHC stimule l'expression hépatocytaire de IRF-1.

Afin de déterminer le rôle de IRF-1 dans l'activation hépatocytaire de IDO-1, nous avons surexprimé IRF-1 dans les cellules Huh7.5.1 par transfection d'un plasmide pcDNA IRF-1 puis nous avons quantifié l'expression de IDO-1 par RT-PCR. L'efficacité de la transfection a été vérifiée en analysant l'expression de la protéine IRF-1 par Western Blotting (Figure 31C). Comme indiqué dans la Figure 31C, la surexpression de IRF-1 suffisait à stimuler l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1, suggérant que IRF-1 est un facteur clé de l'activation de IDO-1 dans les hépatocytes. Pour confirmer ce résultat, nous avons mesuré l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1 stimulées par l'IFN-γ lorsque l'expression de IRF-1 était inhibée par *silencing*. Nous avons observé que le blocage de l'expression de IRF-1 dans les cellules Huh7.5.1 inhibait presque entièrement l'expression de IDO-1 (Figure 31D).

Ces résultats indiquent que l'expression hépatocytaire de IDO-1 est régulée par le facteur de transcription IRF-1.

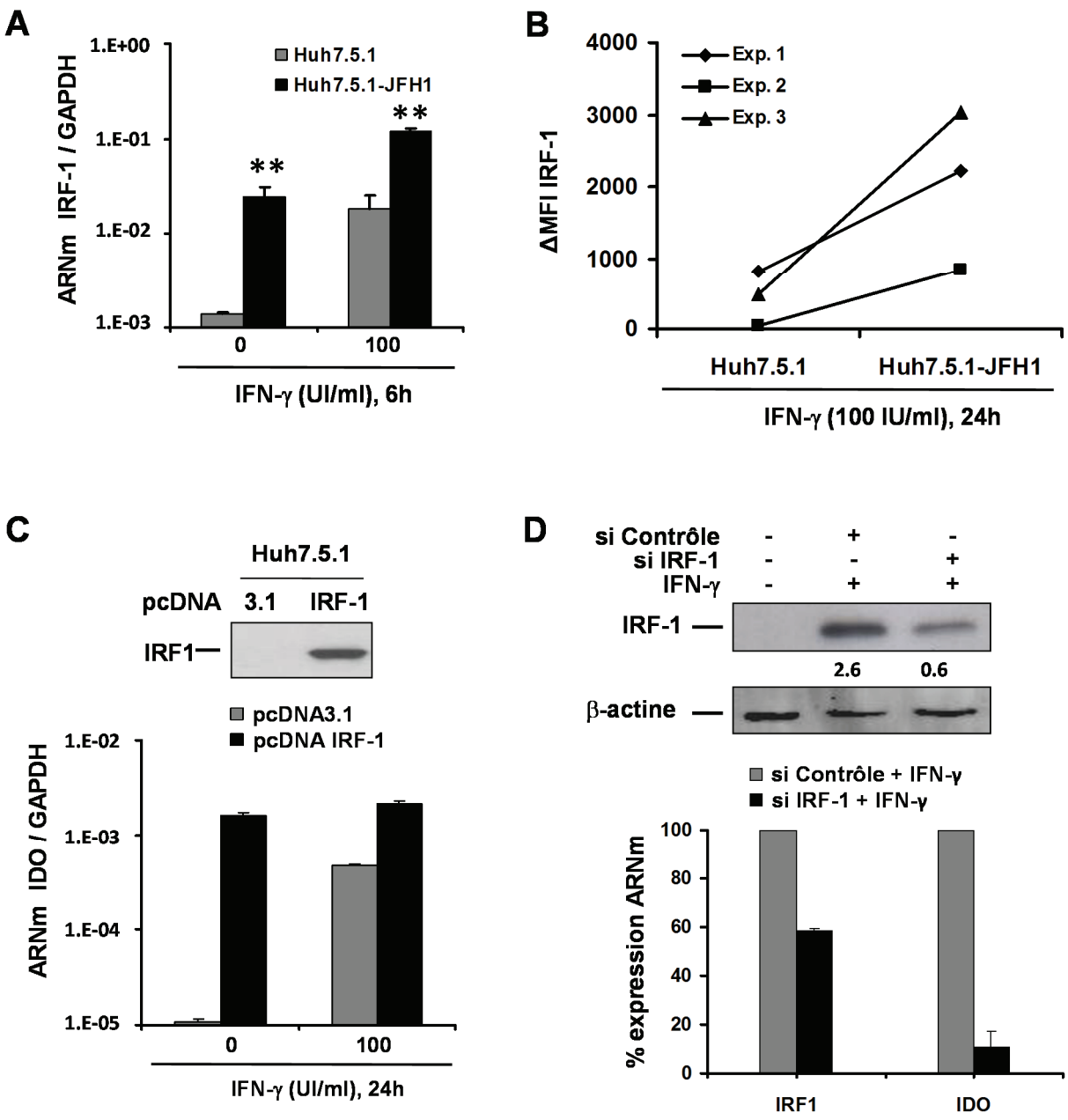


Figure 31 : IRF-1 régule l'expression hépatique de IDO-1 induite par le VHC.

(A) *L'expression de IRF-1 a été analysée dans les cellules Huh7.5.1 infectées et non-infectées par le JFH1 en présence ou en absence de stimulation par l'IFN-γ (6h). Les taux d'ARNm de IRF-1 ont été normalisés sur ceux de la GAPDH.* ***(B)*** *L'expression de la protéine IRF-1 induite par l'IFN-γ dans les cellules infectées et non infectées est exprimée en delta de* Mean fluoresence Intensity *(ΔMFI) correspondant au calcul : (MFI des cellules stimulées par l'IFN-γ) - (MFI des cellules non stimulées).* ***(C)*** *Les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec un plasmide pcDNA IRF-1 ou avec un plasmide contrôle pcDNA 3.1. L'expression de IRF-1 a été vérifiée 48h après la transfection par Western Blotting. L'expression des ARNm de IDO-1 dans les cellules transfectées est montrée en présence et en absence d'IFN-γ.* ***(D)*** *IRF-1 a été inhibé par silencing dans les cellules Huh7.5.1. L'efficacité du silencing de IRF-1 a été vérifiée par Western Blotting en comparaison avec un siARN contrôle. Les chiffres représentent l'analyse densitométrique des bandes de IRF-1 normalisées sur la β-actine. Les cellules ont ensuite été*

*stimulées avec l'IFN-γ (50 UI/ml pendant 7h) et l'expression des ARNm de IRF-1 et de IDO-1 a été déterminée par RT-PCR. Les données sont montrées en pourcentage d'expression du gène d'intérêt (IRF-1 ou IDO-1) dans les cellules transfectées avec les siARN dirigés contre IRF-1 par rapport aux cellules transfectées avec le siARN contrôle. Les résultats des graphiques en (A), (C) et (D) représentent les moyennes ± DS des valeurs mesurées au cours de deux expériences indépendantes. *p<0,05, **p<0,01.*

De précédentes études ont suggéré que l'expression de IDO-1 induite par l'IFN-γ était médiée par la coopération entre les facteurs de transcription IRF-1 et STAT-1 (Chon et al., 1996; Jeong et al., 2009). Nous avons donc étudié les niveaux d'expression et l'activation de STAT-1 dans les cellules Huh7.5.1 infectées par le JFH1. Comme indiqué en Figures 32A et B, l'expression des ARNm et de la protéine STAT-1 ne variait pas significativement entre les cellules Huh7.5.1 infectées et non-infectées par le JFH1, que ce soit en présence ou en absence d'IFN-γ. Cependant, nous avons observé que la phosphorylation de STAT-1 induite par l'IFN-γ était prolongée dans les cellules Huh7.5.1 infectées par le VHC par rapport aux cellules non-infectées, bien que l'infection par le VHC n'induisait pas en elle-même une phosphorylation de STAT-1 détectable par Western Blotting (Figure 32B). La phosphorylation prolongée de STAT-1 pourrait contribuer à l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1 infectées par le VHC en présence d'IFN-γ.

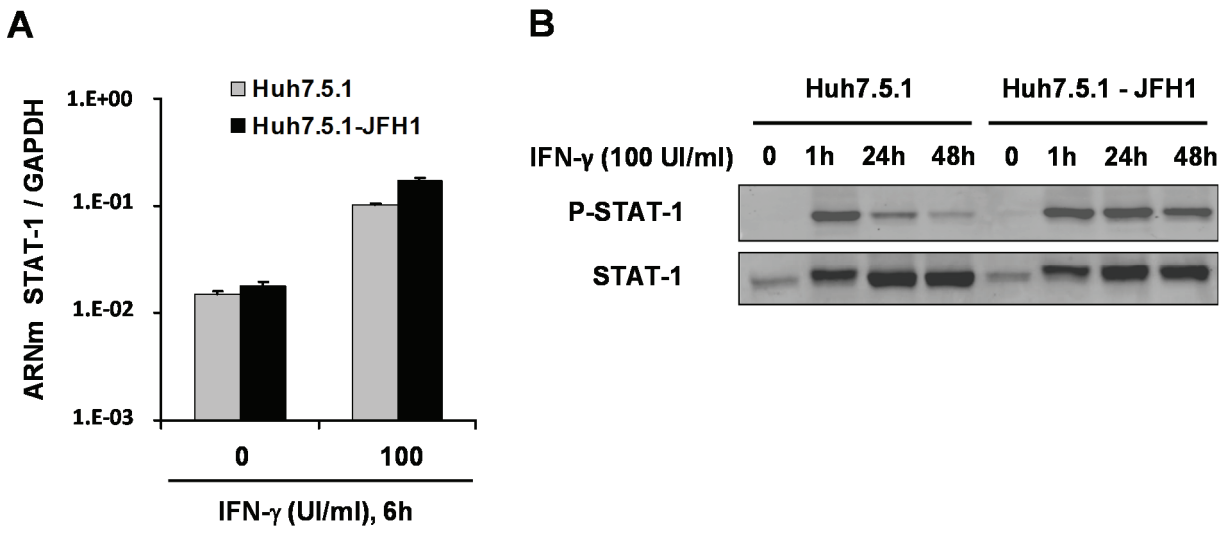


Figure 32 : Activation de STAT-1 dans les cellules Huh7.5.1 infectées par le JFH1 et stimulées par l'IFN-γ.

***(A)** L'expression des ARNm de STAT-1 a été analysée dans les cellules Huh7.5.1 infectées ou non-infectées par le JFH1 et normalisée sur l'expression de la GAPDH. Les résultats représentent les moyennes ± DS des valeurs mesurées au cours de deux expériences indépendantes. **(B)** Après*

traitement par l'IFN-γ (100 UI/ml), les cellules ont été recueillies aux temps indiqués. L'expression intracellulaire de STAT-1 et de la forme phosphorylée de STAT-1 (P-STAT-1, Y701) a été déterminée par Western Blotting.

VIII. Expression hépatocytaire de IDO-1 et blocage pharmacologique de son activité enzymatique: validation du modèle

Pour évaluer l'impact de l'expression hépatique de IDO-1 sur la réplication du VHC et sur la prolifération des lymphocytes T, nous avons choisi de surexprimer IDO-1 dans les HPH et des cellules Huh7.5.1 par transfection d'un plasmide pcDNA IDO (Thomas et al., 2007). Au cours d'une première étape, nous avons vérifié que ce modèle induisait bien la production d'une protéine IDO-1 fonctionnellement active. Comme indiqué dans la Figure 33A, l'expression de IDO-1 était détectable par Western Blotting dans les cellules Huh7.5.1 et dans les HPH transfectés avec le plasmide pcDNA IDO. En présence de L-Try (100 µM), l'expression de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1 induisait une accumulation de L-Kyn dans le surnageant de culture. A l'inverse, la transfection du plasmide contrôle pcDNA 3.1 dans les Huh7.5.1 n'induisait pas la production de L-Kyn (Figure 33B). Ces résultats indiquent que la transfection du plasmide pcDNA IDO dans les hépatocytes induit bien la synthèse d'une protéine IDO-1 fonctionnellement active.

Différents inhibiteurs de IDO ont été proposés *in vitro* et/ou *in vivo* dont le 1-méthyl-DL-tryptophane (1-DL-MT) et la nécrostatine-1 (Austin and Rendina, 2014; Takahashi et al., 2012). Afin de comparer l'impact de ces 2 inhibiteurs sur l'activité de IDO-1 dans notre modèle, nous les avons incubé à différentes concentrations avec des cellules Huh7.5.1 surexprimant IDO-1 en présence de L-Try (100 µM) puis nous avons quantifié l'apparition de L-Kyn dans le milieu de culture par une réaction colorimétrique. Comme indiqué dans la Figure 33B, les concentrations de L-Kyn dans le milieu réactionnel diminuaient de manière dose-dépendante en présence de 1-DL-MT, ce qui témoigne de l'efficacité du blocage de IDO-1 par cet inhibiteur. Pour vérifier que la baisse des concentrations en L-Kyn observée en présence de 1-DL-MT est bien liée à l'inhibition de IDO-1 et non à un effet cytotoxique du 1-DL-MT, la viabilité cellulaire en présence de différentes concentrations de 1-DL-MT a été évaluée par un test MTT. Comme supposé, nous n'avons pas observé de cytotoxicité liée au 1-DL-MT aux concentrations utilisées (Figure 33C). L'incubation des cellules Huh7.5.1 surexprimant IDO-1 avec la nécrostatine-1 permettait également de réduire l'accumulation de L-Kyn dans le milieu de culture (Figure 33D). Néanmoins, les doses de nécrostatine-1 nécessaires pour bloquer l'activité de IDO-1 étaient plus élevées que celles utilisées pour le 1-DL-MT.

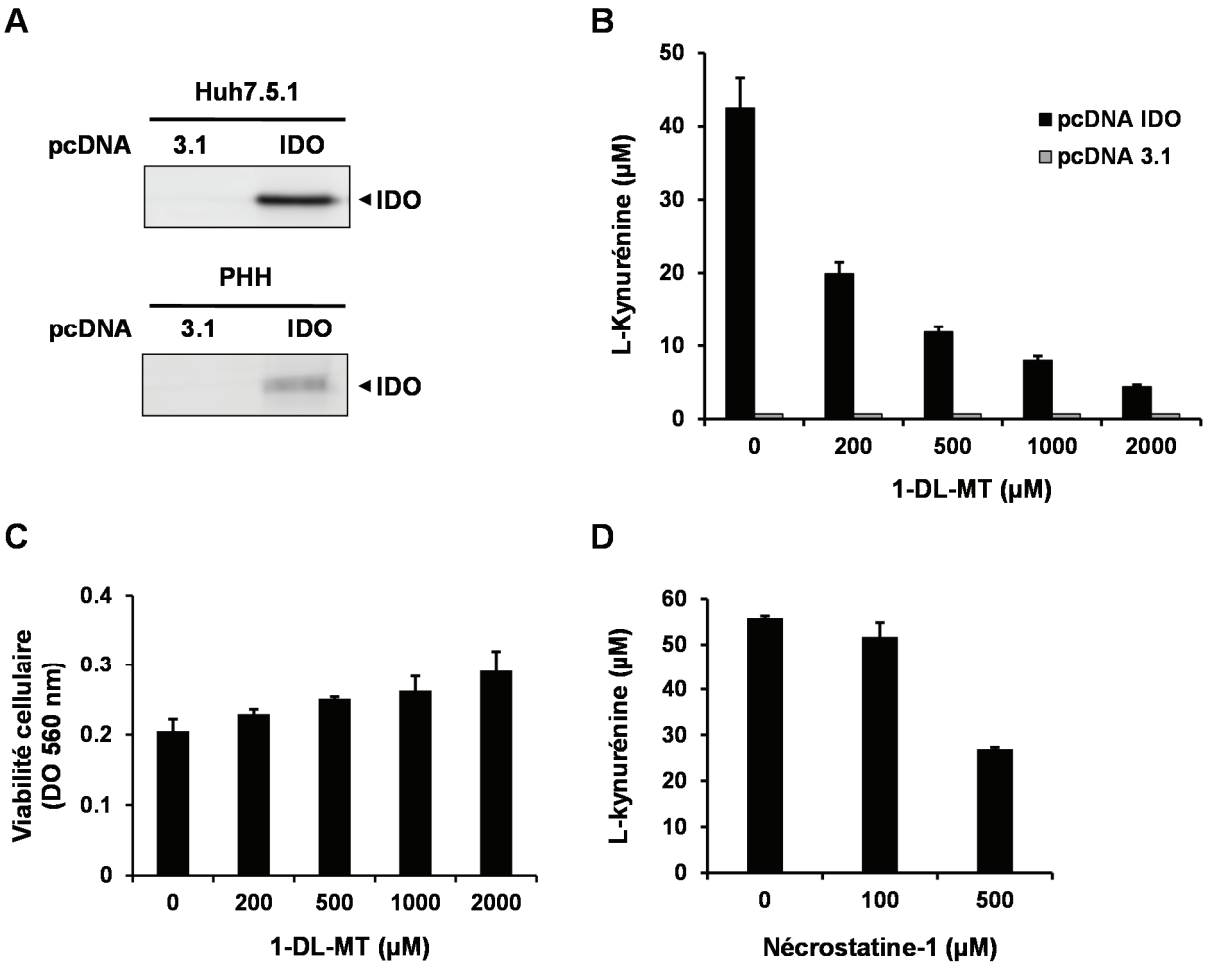


Figure 33 : Surexpression de IDO-1 dans les hépatocytes et blocage de son activité enzymatique. ***(A)*** *les cellules Huh7.5.1 et les HPH (H0204, H0216, H0208) ont été transfectés avec un plasmide pcDNA IDO ou avec un plasmide contrôle pcDNA 3.1. Après 48h, les cellules ont été recueillies et l'expression de IDO-1 a été déterminée par Western Blotting.* ***(B)*** *L'activité fonctionnelle de IDO-1 et son inhibition par le 1-DL-MT aux concentrations indiquées ont été déterminées en incubant les cellules Huh7.5.1 avec du L-Try (100 µM) puis en mesurant l'accumulation de L-Kyn par réaction colorimétrique de Ehrlich.* ***(C)*** *L'absence de cytotoxicité du 1-DL-MT pour les cellules Huh7.5.1 aux concentrations indiquées et en présence de L-Try (100 µM) a été vérifiée par un test MTT.* ***(D)*** *Le blocage de l'activité de IDO-1 par la nécrostatine-1 a été déterminée en incubant les cellules Huh7.5.1 transfectées pour IDO-1 avec du L-Try (100 µM) puis en mesurant l'accumulation de L-Kyn par colorimétrie. Les résultats en (B), (C) et (D) représentent les moyennes ± DS des valeurs mesurées au cours de deux expériences indépendantes.*

IX. IDO-1 exerce une action antivirale sur le VHC

L'expression de IDO inhibe la prolifération de nombreuses espèces bactériennes, parasitaires ou fongiques et bloque la réplication de plusieurs virus *in vitro* (Barth and Raghuraman, 2014). Nous avons donc voulu déterminer si l'expression hépatique de IDO-1 a un effet antiviral sur le VHC.

Pour étudier l'impact de IDO-1 sur l'entrée du VHC dans les hépatocytes, nous avons produit des pseudo-particules virales (VHCpp) exprimant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe du VHC de génotype 1b (variant HCV-J) ou de génotype 2a (variant JFH1). Comme indiqué sur la Figure 34A, l'entrée des VHCpp dans les HPH et les cellules Huh7.5.1 n'était pas modifiée par la surexpression de IDO-1, suggérant que IDO-1 n'influence pas l'étape d'entrée du VHC dans les hépatocytes.

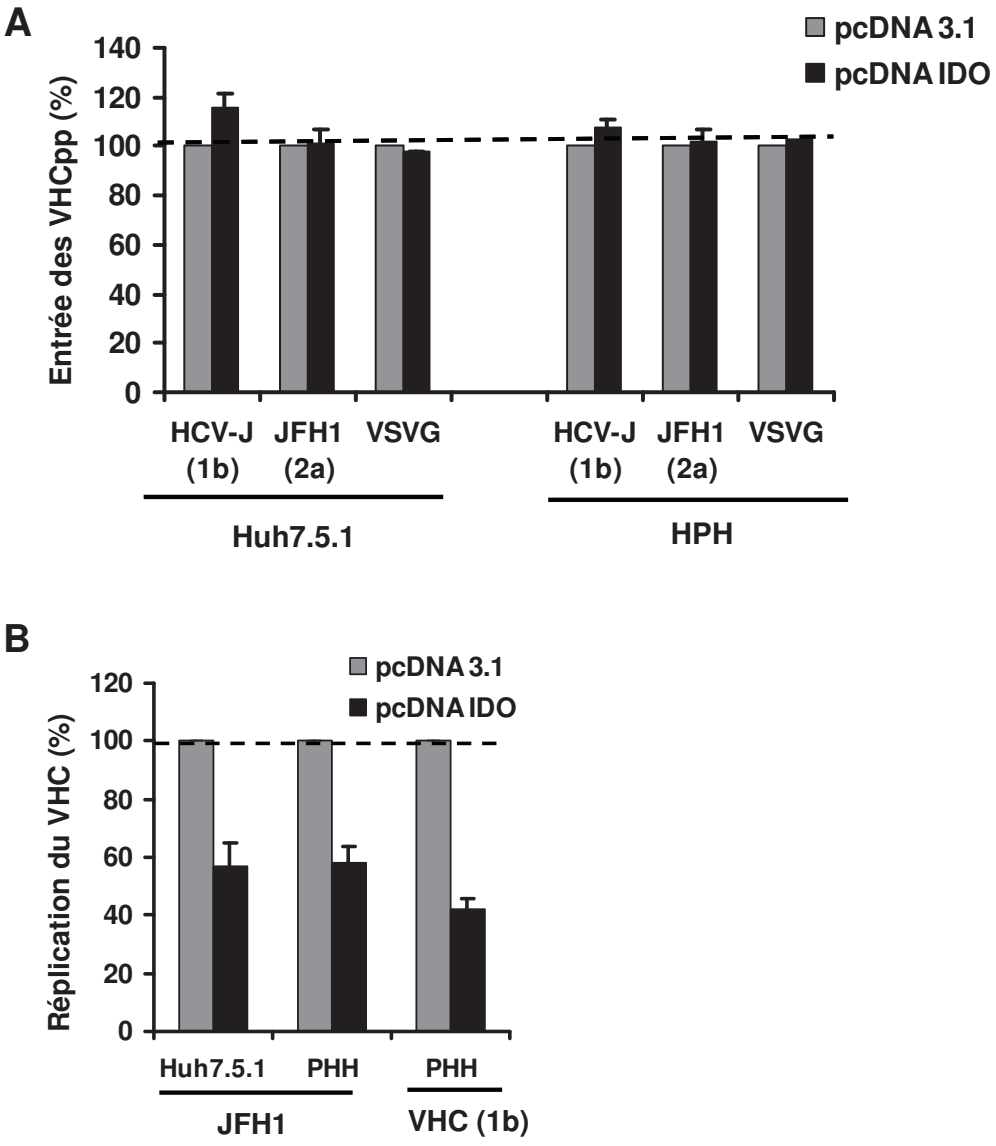
Pour déterminer si IDO-1 influence les autres étapes du cycle de réplication du VHC, nous avons infecté des HPH et des Huh7.5.1 surexprimant IDO-1 avec des VHCcc (variant JFH1) et nous avons analysé la réplication virale par RT-PCR quantitative. Comme indiqué sur la Figure 34B, l'expression de IDO-1 dans les HPH et les Huh.5.1 diminuait la réplication du JFH1 d'environ 50 %. Pour confirmer ce résultat, nous avons incubé des HPH surexprimant IDO-1 avec le sérum d'un patient contenant du VHC de génotype 1b. Comme observé précédemment avec les VHCcc, la surexpression de IDO-1 inhibait la réplication de cet isolat clinique du VHC dans les HPH (Figure 34B).

Les réplicons subgénomiques du VHC sont des outils précieux pour étudier la réplication intracellulaire du VHC *in vitro*. En conséquence, nous avons utilisé un réplicon subgénomique codant pour les protéines NS3-NS5B du VHC (isolat Con1, génotype 1b) et contenant le gène rapporteur de la luciférase : le réplicon Rep-PI-Luc (Lohmann et al., 2003). Au cours d'une expérience préliminaire, nous avons constaté que le réplicon Rep-PI-Luc se répliquait efficacement dans les Huh7.5.1, avec une augmentation des taux d'ARN viraux à 48h et 72h post-transfection (Figure 34C). Pour étudier l'impact de IDO-1 sur la réplication du Rep-PI-Luc, nous avons co-transfecté des cellules Huh7.5.1 avec le pcDNA IDO et avec l'ARN du réplicon. Comme observé précédemment avec le modèle des VHCcc et avec l'isolat clinique du VHC, l'expression de IDO-1 inhibait partiellement (environ 45 %) la réplication du réplicon subgénomique du VHC (Figure 34D).

Puisque le facteur de transcription IRF-1 était impliqué dans l'expression de IDO-1 induite par le VHC dans les hépatocytes (voir ci-dessus), nous avons analysé l'impact de IRF-1 sur la réplication du VHC par une expérience de *silencing*. Comme indiqué dans la Figure 34E, l'extinction de *IRF-1* par *silencing* augmentait la réplication du JFH1 dans les cellules Huh7.5.1, suggérant un effet antiviral de IRF-1.

L'ensemble de ces résultats indique que l'expression de IDO-1 dans les hépatocytes exerce un effet antiviral sur le VHC en inhibant partiellement sa réplication *in vitro*.

Afin de confirmer que l'effet antiviral de IDO-1 sur la réplication du VHC est lié à son activité enzymatique, nous avons bloqué l'activité de IDO-1 dans les cellules Huh7.5.1 en utilisant le 1-DL-MT. La présence de 1-DL-MT dans le milieu réactionnel restaurait totalement la réplication du JFH1 dans les cellules Huh7.5.1 (Figure 34F). Ce résultat indique que IDO-1 exerce un rôle antiviral sur la réplication du VHC via la déplétion en tryptophane et/ou l'accumulation de kynurénines.



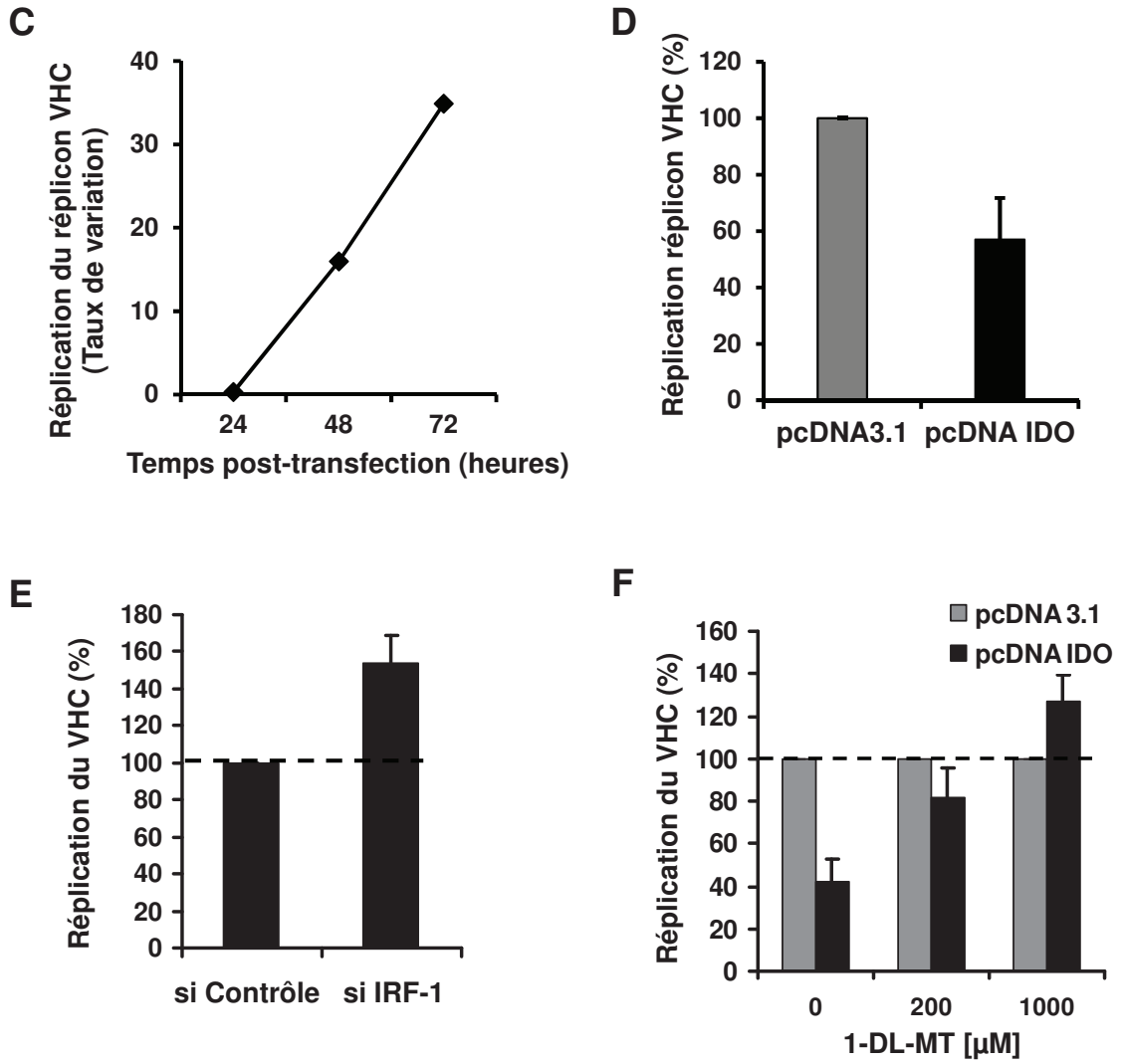


Figure 34 : Impact de l'expression hépatique de IDO-1 sur la réplication du VHC.

(A) *Entrée des VHCpp dans les hépatocytes exprimant IDO-1. 48h après la transfection de plasmides pcDNA IDO ou pcDNA 3.1, les cellules Huh7.5.1 et les HPH ont été incubés avec des VHCpp de génotype 1b (HCV-J) ou 2a (JFH1). L'entrée des VHCpp dans les hépatocytes a été évaluée par mesure de l'activité luciférase. Les données sont exprimées en pourcentage d'entrée des VHCpp dans les cellules transfectées avec le pcDNA IDO par rapport aux cellules contrôles transfectées avec pcDNA 3.1 (=100%). Des pseudo-particules virales exprimant la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSVG) ont été utilisées comme contrôle.* ***(B)*** *48h après transfection, les cellules Huh7.5.1 et les HPH ont été incubées avec le JFH1 ou avec le sérum d'un patient infecté par le VHC (génotype 1b). Après 48h, l'ARN du VHC dans les cellules a été quantifié par RT-PCR et normalisé sur la GAPDH. Les données sont montrées en pourcentage moyen de réplication du VHC par comparaison avec les cellules transfectées avec le pcDNA 3.1 (=100%).* ***(C)*** *Efficacité de la réplication du réplicon subgénomique Rep-PI-Luc dans les cellules Huh7.5.1. La réplication du réplicon Rep-PI-Luc (isolat Con1, génotype 1b) a été évaluée par mesure de l'activité luciférase. Les résultats montrent l'augmentation de l'expression de luciférase aux temps indiqués par rapport à l'expression initiale à*

5h post-transfection (Taux de variation). ***(D)*** *Les cellules Huh7.5.1 ont été co-transfectées avec le réplicon Rep-PI-Luc et avec un plasmide pcDNA IDO ou pcDNA 3.1. Après 72h, la réplication du réplicon a été évaluée par mesure de l'activité luciférase. Les données sont exprimées en pourcentage de réplication du réplicon dans les cellules transfectées avec pcDNA IDO par rapport aux cellules contrôles transfectées avec pcDNA 3.1 (=100%).* ***(E)*** *Les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec des siARN dirigés contre IRF-1 ou avec un siARN contrôle puis infectées par le JFH1. Après 48h, l'ARN du VHC dans les cellules a été quantifié par RT-PCR et normalisé sur l'expression de la GAPDH. Les données sont montrées en pourcentage moyen de réplication du VHC par comparaison avec les cellules transfectées avec le siARN contrôle (=100%).* ***(F)*** *Restauration de la réplication de JFH1 dans les Huh7.5.1 après blocage de IDO-1 par le 1-DL-MT. Les résultats représentent les moyennes ± DS des valeurs mesurées au cours de trois expériences indépendantes.*

X. IDO-1 contribue à l'effet antiviral des interférons

Afin de déterminer si IDO-1 participe à la réponse immunitaire innée contre le VHC médiée par les IFNs de type I, nous avons mené des expériences d'extinction de son gène dans les cellules Huh7.5.1. Après blocage de l'expression de IDO-1 par *silencing*, les cellules Huh7.5.1 ont été infectées par des VHCcc (JFH1) puis traitées par des doses suboptimales d'IFN-α (10 UI/ml) (Figure 35A). L'utilisation de faibles doses d'IFN-α était rendue nécessaire car des doses plus élevées auraient inhibé l'action des siARN. Cinq jours après la transfection, nous avons observé une diminution de l'expression de IDO-1 d'environ 70 % dans les cellules transfectées avec des siARN anti-IDO-1 par rapport aux cellules témoins transfectées avec des siARN aspécifiques, ce qui témoigne de l'efficacité du *silencing* (Figure 35B). Comme indiqué dans la Figure 35C, l'IFN-α utilisé à faible dose diminuait la réplication du JFH1 d'environ 50 % dans les cellules Huh7.5.1. Pour vérifier que cette baisse de la réplication était bien directement due à l'action de l'IFN-α, nous avons bloqué l'expression de la sous-unité IFNAR2 de son récepteur par *silencing*. Comme supposé, le blocage de l'expression de IFNAR2 restaurait la réplication du JFH1 dans les cellules Huh7.5.1 exposées à l'IFN-α (Figure 35C), ce qui indique que la baisse de réplication du JFH1 en présence d'IFN-α est bien directement liée à l'action antivirale de l'IFN-α. Plus important, le blocage de l'expression de IDO-1 restaurait la réplication du JFH1 dans les cellules Huh7.5.1 infectées et traitées par l'IFN-α. Ce résultat indique que IDO-1 contribue à l'effet antiviral de l'IFN-α au cours de l'infection par le VHC.

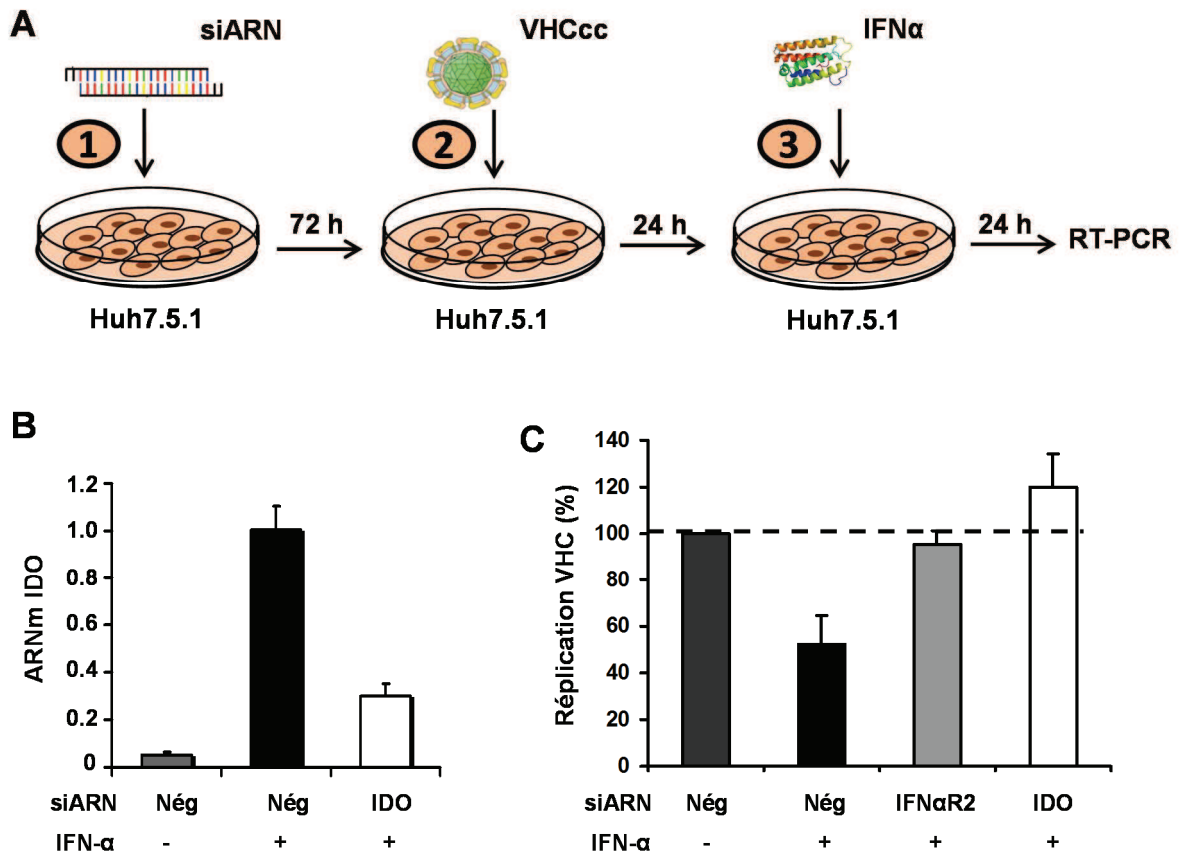


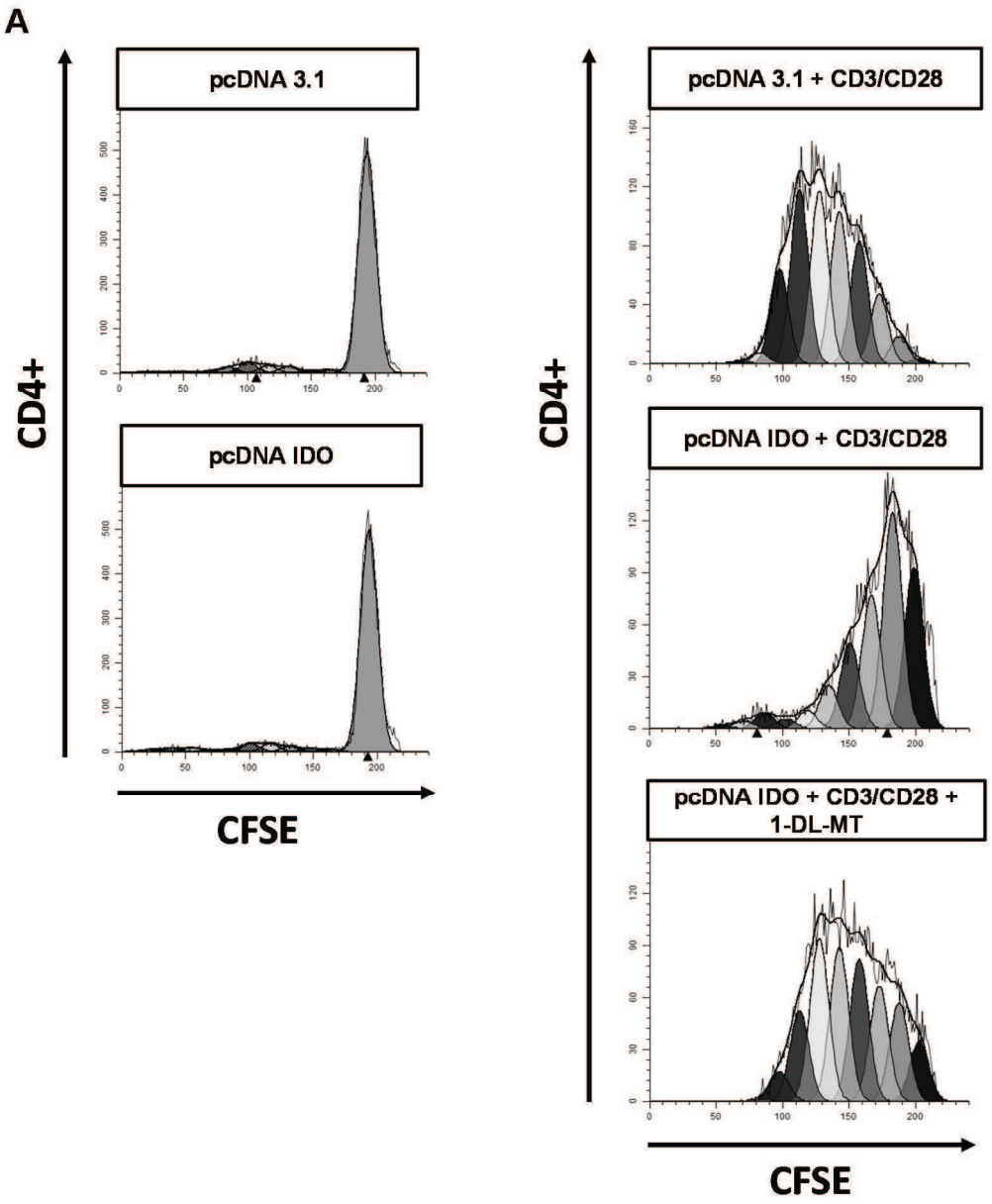
Figure 35 : IDO-1 contribue à l'effet anti-VHC de l'IFN-α.

(A) *Représentation schématique de l'expérience réalisée. Les cellules ont été transfectées avec des siARN dirigés contre IDO-1, contre la sous-unité IFNAR2 du récepteur de l'IFN-α ou avec des siARN contrôles. Après 72h, les cellules ont été infectées par du JFH1 puis traitées par l'IFN-α après 24h supplémentaires. Au bout de 24h, les cellules ont été recueillies et la réplication du VHC a été évaluée par RT-PCR.* ***(B)*** *Efficacité de l'extinction de l'expression de IDO-1. Les quantités d'ARNm de IDO-1 ont été déterminées par RT-PCR 5 jours après la transfection des siARN anti-IDO-1 ou des siARN contrôles.* ***(C)*** *Expression intracellulaire de l'ARN du VHC. Les données sont exprimées en pourcentage de réplication du VHC par rapport à des cellules transfectées avec des siARN contrôles (=100%). Les résultats représentent les moyennes ± DS des valeurs mesurées au cours de trois expériences indépendantes.*

XI. IDO-1 produite par les hépatocytes inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4$^+$

L'expression de IDO-1 dans les cellules dendritiques inhibe l'activation et la prolifération des lymphocytes T (Mellor and Munn, 2004). Afin de déterminer si l'expression de IDO-1 par les hépatocytes participe également à la régulation de la réponse lymphocytaire T, nous avons développé un modèle de co-culture impliquant d'une part des cellules Huh7.5.1 exprimant

IDO-1 et d'autre part des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs ou activés. L'activation des lymphocytes T $CD4^+$ a été réalisée par stimulation de leurs récepteurs CD3 et CD28 par des anticorps spécifiques en présence d'interleukine 2. La prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ a été évaluée par expression du CFSE en cytométrie de flux. Comme indiqué dans la Figure 36A, la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs n'était pas influencée par le contact avec des cellules Huh7.5.1 exprimant IDO-1 (pcDNA IDO) ou avec des cellules Huh7.5.1 contrôles (pcDNA 3.1). A l'inverse, la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ activés était significativement réduite au contact des cellules Huh7.5.1 exprimant IDO-1 (Figure 36A), se traduisant par une chute de l'index de prolifération cellulaire (Figure 36B). Ce résultat suggère que l'expression hépatique de IDO-1 inhibe localement la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ activées. Le blocage pharmacologique de IDO-1 par le 1-DL-MT restaurait partiellement la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ activés (Figures 36A et B), ce qui suggère que IDO-1 régule la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ grâce à son activité enzymatique sur le tryptophane.


A
pcDNA 3.1
pcDNA IDO
pcDNA 3.1 + CD3/CD28
pcDNA IDO + CD3/CD28
pcDNA IDO + CD3/CD28 + 1-DL-MT
CD4+
CFSE

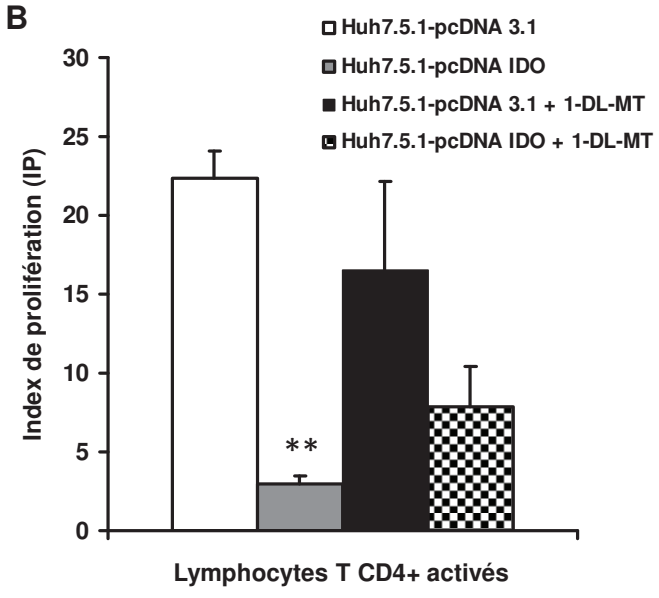

B
Huh7.5.1-pcDNA 3.1
Huh7.5.1-pcDNA IDO
Huh7.5.1-pcDNA 3.1 + 1-DL-MT
Huh7.5.1-pcDNA IDO + 1-DL-MT
Index de prolifération (IP)
Lymphocytes T CD4+ activés
**

Figure 36 : L'expression hépatique de IDO-1 inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ activés. ***(A)*** *Analyse par cytométrie de flux de l'expression du CD4 et du CFSE dans les lymphocytes T CD4⁺ en co-culture avec des cellules Huh7.5.1. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été marqués au CFSE pour suivre leur prolifération. Les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec le plasmide pcDNA IDO ou avec le vecteur d'expression d'origine pcDNA 3.1. Après 48h, les cellules Huh7.5.1 ont été incubées avec des lymphocytes T CD4⁺ non activés (panel de gauche) ou avec des lymphocytes T CD4⁺ activés par des anticorps anti-CD3/CD28 en présence d'IL-2 (panel de droite). Les graphiques montrent l'intensité de fluorescence du CFSE exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ au cours de leurs divisions.* ***(B)*** *Indice de prolifération des lymphocytes T CD4⁺ activés. Les résultats représentent les moyennes ± DS des valeurs mesurées au cours de trois expériences indépendantes. L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ au contact des Huh7.5.1 exprimant IDO-1 était statistiquement significative (**p<0,01). La présence de 1-DL-MT (1000 µM) restaurait partiellement la prolifération des lymphocytes T CD4⁺.*

DISCUSSION

I. Expression de IDO dans les hépatocytes infectés par le VHC

Au cours de notre travail, nous avons démontré que les hépatocytes humains expriment IDO lorsqu'ils sont stimulés par l'IFN-γ et à un moindre degré par l'IFN-α. La stimulation des hépatocytes par l'IFN-γ entraine l'expression d'une forme fonctionnellement active de IDO, capable de dégrader le Try en Kyn. Plus important encore, nous avons observé que l'infection par le VHC induit l'expression de IDO dans les hépatocytes humains.

Bien que l'expression de IDO ait été observée dans de nombreux tissus et organes chez l'homme (Yamazaki et al., 1985), son expression hépatique est restée longtemps controversée (Sono et al., 1996; Takikawa, 2005). Il était notamment constaté que certaines lignées cellulaires d'origine hépatique comme les cellules HepG2 et HLEC n'expriment pas IDO lorsqu'elles sont stimulées par l'IFN-γ (Taylor and Feng, 1991). L'absence d'expression de IDO dans les cellules HepG2 pourrait être liée à l'existence d'une forme tronquée ou instable de IRF-1 dans ces cellules, conduisant à un défaut de transcription du gène *IDO-1* (Konan and Taylor, 1996). Pour éviter de tels biais expérimentaux et nous rapprocher des conditions physiologiques, nous avons choisi d'utiliser des hépatocytes primaires humains afin de confirmer l'expression hépatique de IDO. En plus des hépatocytes primaires humains, nous avons constaté que les ARNm de IDO sont exprimés dans les cellules hépatocytaires Huh7.5.1. Cependant, malgré la détection des ARNm de IDO dans les cellules Huh7.5.1, nous n'avons pas réussi à détecter l'expression de IDO par Western Blotting, ce qui suggère que IDO est exprimée à bas niveau dans ces cellules lorsqu'elles sont stimulées par l'IFN-γ. L'expression de IDO était par contre significativement augmentée lorsque les cellules Huh7.5.1 étaient à la fois stimulées par l'IFN-γ et infectées par le VHC.

En conditions physiologiques, la production d'IFN-γ est principalement attribuée aux cellules NK et aux lymphocytes T activés. Lorsque nous avons placé des lymphocytes T $CD4^+$ activés au contact des cellules Huh7.5.1 dans un modèle de co-culture, la libération d'IFN-γ de la part des lymphocytes T $CD4^+$ suffisait à induire l'expression de IDO dans les cellules Huh7.5.1. Ces résultats suggèrent que l'afflux de lymphocytes T activés dans le parenchyme hépatique au cours de l'infection par le VHC pourrait agir en complément du virus (voire en synergie avec le virus) pour stimuler la production de IDO dans les hépatocytes. En faveur de cette hypothèse, une étude antérieure a montré que la co-culture de lymphocytes T produisant de l'IFN-γ avec des cellules Huh7 infectées par le VHC entrainait une expression de IDO dans les cellules Huh7 cent fois supérieure à celle observée lorsque les cellules Huh7

étaient stimulées uniquement par de l'IFN-γ (Larrea et al., 2007). L'ensemble de ces résultats plaide pour une activation de IDO dans les hépatocytes au cours de l'infection par le VHC. Cette activation de IDO pourrait être médiée à la fois par le virus et par l'IFN-γ provenant des cellules immunes activées dans le parenchyme hépatique.

II. Rôle antiviral de IDO sur le VHC

L'expression de IDO induite par le VHC dans les hépatocytes primaires humains coïncidait avec la production des interférons et de certains gènes stimulés par les interférons, ce qui suggère que IDO pourrait être impliquée dans les mécanismes de défense de l'immunité innée antivirale. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'impact de IDO sur la réplication du VHC grâce à plusieurs modèles *in vitro* : des VHCcc de variant JFH1 (génotype 2a), un isolat clinique de patient (génotype 1b) et un modèle de réplicon subgénomique du VHC (Con1, génotype 1b). Avec chacun de ces modèles, nous avons observé une inhibition partielle de la réplication du VHC dans les hépatocytes primaires et/ou les cellules Huh7.5.1 exprimant IDO, ce qui suggère que IDO possède une activité antivirale contre le VHC. Le blocage de IDO par un inhibiteur compétitif du Try, le 1-DL-MT, restaurait totalement la réplication du VHC, ce qui indique que l'effet antiviral de IDO sur le VHC est lié à son action enzymatique sur le Try.

Nos résultats confirment de récentes études montrant qu'au moins trois autres membres de la famille des *Flaviviridae*, le virus de la dengue, le virus West Nile et le virus de l'encéphalite japonaise, activent l'expression de IDO *in vitro* (Becerra et al., 2009; Yeung et al., 2012). Comme observé dans notre étude, le pic d'expression de IDO dans les macrophages infectés par le virus West Nile et dans les DCs infectées par le virus de la dengue était maximal à 48h post-infection. En retour, l'expression de IDO dans les macrophages et les DCs inhibait partiellement la réplication des virus West Nile et de la dengue. Dans les deux cas, la supplémentation du milieu de culture en Try restaurait la réplication virale, ce qui suggère que l'activité antivirale de IDO contre ces *Flavivirus* est médiée par son action métabolique (Becerra et al., 2009; Yeung et al., 2012). De manière intéressante, IDO restreignait également la réplication d'un autre virus hépatique, le VHB, dans un modèle *in vitro* (Mao et al., 2011). Là encore, l'activité métabolique de IDO était directement impliquée dans son action antivirale.

Le catabolisme des acides aminés qui accompagne la réponse inflammatoire est une stratégie très ancienne de défense innée contre les microorganismes (Grohmann and Bronte, 2010; McGaha et al., 2012). La réplication de nombreux virus appartenant à des familles virales très différentes est inhibée par IDO *in vitro* (Barth and Raghuraman, 2014;

Schmidt and Schultze, 2014). Pourtant, contrairement à certaines bactéries ou aux parasites, les virus ne sont pas affectés par l'auxotrophie. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet antiviral de IDO ne sont pas bien connus. Il a été constaté que la déplétion en Try inhibe la croissance cellulaire *in vitro* (Takikawa et al., 1988). Puisque la réplication virale est dépendante de la machinerie cellulaire et du métabolisme de la cellule hôte, la déplétion en Try pourrait induire un environnement intracellulaire défavorable à la réplication virale. Récemment, Mao *et al.* ont observé que la déplétion en Try dans les cellules HepG2 infectées par le VHB affectait préférentiellement la réplication du génome viral et la traduction des protéines virales mais n'altérait pas significativement la synthèse protéique globale dans les cellules (Mao et al., 2011). Cette observation suggère que l'effet antiviral de IDO dans les hépatocytes (ou peut être aussi dans les autres cellules) n'est pas dû à un stress global de la cellule qui paralyserait la machinerie cellulaire mais bien à une défense spécifique de la cellule hôte contre l'agent pathogène.

La production d'IFNs de type I par les hépatocytes infectés forme la première ligne de défense de l'hôte contre le VHC. L'effet antiviral des IFNs sur le VHC est médié par l'action combinée de multiples ISGs (Metz et al., 2012a; Schoggins et al., 2011). Pour déterminer si *IDO-1* appartient aux ISGs exprimés pour faire face à l'infection par le VHC, nous avons bloqué son expression dans des cellules Huh7.5.1 infectées par le VHC et soumises à l'action de l'IFN-α. Le blocage de IDO restaurait totalement la réplication du VHC dans les cellules traitées par l'IFN-α, ce qui suggère que IDO contribue significativement à l'effet antiviral de l'IFN-α sur le VHC. L'ensemble de nos résultats plaide en faveur d'un effet antiviral de IDO sur le VHC *in vitro*. L'expression de IDO par les hépatocytes infectés est intégrée à la réponse immunitaire innée mise en place pour lutter contre le virus.

L'expression de IDO induit à la fois une déplétion en Try et une accumulation de kynurénines. De nombreuses études ont suggéré que l'activité antivirale de IDO est médiée avant tout par la déplétion en Try (Adams et al., 2004a; Becerra et al., 2009; Yeung et al., 2012). Bien que certaines kynurénines telles que la Kyn et la 3-HK possèdent des propriétés antimicrobiennes *in vitro* (Niño-Castro et al., 2014), leur impact sur la réplication virale a été peu étudié à ce jour. Des études supplémentaires pourraient permettre de préciser l'impact respectif de la déplétion en Try et de l'accumulation de kynurénines sur la réplication du VHC dans notre modèle. Par exemple, l'impact de la déplétion en Try sur la réplication du VHC pourrait être évalué en ajoutant du Try d'origine exogène dans le milieu de culture pour compenser l'activité de IDO. De la même manière, l'impact des kynurénines sur la réplication virale pourrait être exploré en stimulant des hépatocytes infectés avec un cocktail de différentes kynurénines à des doses non toxiques.

III. Modalités d'activation de IDO lors de l'infection par le VHC

Le VHC active IRF-1

L'infection des hépatocytes primaires humains et des cellules Huh7.5.1 par le VHC induisait l'expression de IRF-1 dans notre étude. L'analyse du transcriptome de cellules Huh7 infectées par le JFH1 avait également montré une augmentation de l'expression de IRF-1 *in vitro* (Blackham et al., 2010). De la même manière, l'analyse de biopsies hépatiques de patients infectés par le VHC retrouvait une augmentation de l'expression des ARNm de IRF-1 *in vivo* (Abbate et al., 2003). Les modalités d'activation de IRF-1 par le VHC sont mal connues. Comme les autres IRFs, IRF-1 participe à la cascade de signalisation induite par l'activation des *pattern recognition receptors* dans la cellule infectée (Tamura et al., 2008). Il a notamment été montré que la reconnaissance de l'ARN double-brin par la protéine kinase R (PKR) active IRF-1 (Pflugheber et al., 2002; Williams, 1999). L'expression de IRF-1 est également inductible par de nombreuses cytokines au cours de la réaction inflammatoire telles que le TNF-α et surtout les IFNs de types I et II (Nguyen et al., 1997; Ramsauer et al., 2007; Tamura et al., 2008). Dans ce dernier cas, les facteurs de transcription NF-κB et STAT-1 ont été particulièrement impliqués dans la régulation transcriptionnelle de IRF-1 (Pine, 1997). En retour, IRF-1 exerce un rétrocontrôle positif sur l'expression des IFNs de type I en stimulant leur transcription (Nguyen et al., 1997). L'infection des hépatocytes par le VHC est rapidement détectée par les PRRs et notamment par la protéine PKR (Arnaud et al., 2011), conduisant à la transcription de gènes impliqués dans la réponse antivirale et à la production d'IFNs de type I (Horner and Gale, 2013). Les IFNs de type I libérés stimulent de façon autocrine la cellule infectée et induisent l'expression d'ISGs via la voie JAK-STAT. L'expression de IRF-1 au cours de l'infection par le VHC pourrait être déclenchée par l'activation des PRRs ou secondairement induite par les IFNs de type I. En faveur de cette dernière hypothèse, il a récemment été montré que l'induction d'IRF-1 par les *gammaherpesvirus* était dépendante de la libération préalable des IFNs de types I *in vitro* (Mboko et al., 2014). De plus, il a été observé que les motifs ARN double-brin reconnus par le TLR-3 induisent l'expression de IDO via la libération d'IFN-β *in vitro* (Suh et al., 2007). Bien que l'expression de IRF-1 n'ait pas été recherchée dans cette dernière étude, ses résultats suggèrent que la libération des IFNs de type I précède l'activation de IDO induite par le VHC. L'analyse détaillée du mécanisme d'induction de IRF-1 dans notre étude était rendue difficile par le fait que les cellules de la lignée Huh7 présentent des altérations dans les voies de signalisation de certains PRRs comme RIG-I et TLR-3 (Bartenschlager and Pietschmann, 2005). Cette particularité des cellules Huh7 leur permet de supporter de hauts niveaux de réplication virale mais vient biaiser la compréhension des premières étapes de l'immunité innée mise en place par la cellule infectée. Des expériences supplémentaires utilisant des

anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs des IFNs de type I (IFNAR1-IFNAR2), des inhibiteurs de la voie JAK-STAT et des inhibiteurs de NF-κB pourraient permettre de préciser les modalités d'activation de IRF-1 dans les hépatocytes infectés par le VHC.

IRF-1 active l'expression de IDO

IRF-1 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire antivirale ou anti-tumorale (Schneider et al., 2014; Tamura et al., 2008). En particulier, IRF-1 est un puissant activateur de l'expression d'ISGs tels que la 2',5'-oligoadénylate synthase (OAS) (Tamura et al., 2008). De précédentes études ont mis en évidence un rôle clé de IRF-1 dans le contrôle de la réplication du VHC (Kanazawa et al., 2004; Schoggins et al., 2011). Lorsque nous avons éteint l'expression de IRF-1 par *silencing* dans les cellules Huh7.5.1 infectées, nous avons également constaté une augmentation de la réplication de JFH1, ce qui témoigne de l'effet antiviral de IRF-1 sur le VHC.

IRF-1 régule l'expression de IDO en se fixant aux séquences ISRE présentes sur le promoteur de *IDO-1* (Konan and Taylor, 1996). Chez les souris infectées par *Toxoplasma gondii*, la délétion de *IRF-1* abolit totalement l'activité de IDO, ce qui suggère que IRF-1 joue un rôle central dans l'induction de IDO lors des infections *in vivo* (Silva et al., 2002). En conséquence, nous avons étudié l'impact de IRF-1 sur l'expression de IDO dans les hépatocytes. Nous avons montré que l'expression de IRF-1 dans les cellules Huh7.5.1 était suffisante pour activer l'expression de IDO. A l'inverse, le blocage de IRF-1 par *silencing* inhibait considérablement l'expression de IDO dans les cellules Huh7.5.1. L'ensemble de ces résultats indique que l'expression de IDO au cours de l'infection des hépatocytes par le VHC est directement liée à l'activation de IRF-1. Nous suggérons que *IDO-1* appartient aux ISGs régulés par l'IRF-1 en réponse à l'infection par le VHC.

STAT-1 participe à l'expression de IDO

De précédentes études ont suggéré que le facteur de transcription STAT-1 coopère avec IRF-1 pour stimuler l'expression de IDO (Chon et al., 1996; Jeong et al., 2009)(Jeong et al., 2009). Nous avons donc analysé l'expression et l'activation de STAT-1 dans les hépatocytes infectés par le VHC et stimulés par l'IFN-γ. Nous avons observé une phosphorylation prolongée de STAT-1 dans les cellules Huh7.5.1 infectées par le JFH1 en présence d'IFN-γ. Puisque STAT-1 est impliqué dans l'expression de IRF-1 (Ramsauer et al., 2007), l'activation prolongée de STAT-1 pourrait soutenir à la fois l'expression de IRF-1 et celle de IDO. En faveur de cette idée, une expression prolongée de IDO (jusqu'à 40h après stimulation par l'IFN-γ) avait été

constatée dans des hépatocytes infectés par le VHC et stimulés par l'IFN-γ (Larrea et al., 2007). Les auteurs de cette étude n'avaient pas exploré les modalités d'activation de IDO dans les cellules exposées au VHC et à l'IFN-γ. Notre travail suggère que l'expression prolongée de IDO au cours de l'infection par le VHC pourrait être au moins en partie médiée par la phosphorylation de STAT-1. Une phosphorylation prolongée de STAT-1 en présence d'IFN-γ a été mise en évidence dans d'autres modèles d'infections virales *in vitro* tels que l'infection par le virus Sindbis (Burdeinick-Kerr et al., 2009) ou par le CMV murin (Trilling et al., 2014). L'adénovirus induit également une phosphorylation prolongée de STAT-1 en présence d'IFN-α en inhibant la déphosphorylation de STAT-1 médiée par la protéine tyrosine phosphatase TC45 (Sohn and Hearing, 2011).

Des études supplémentaires pourraient permettre de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans la phosphorylation de STAT-1 dans notre modèle *in vitro*. Au cours de la réponse inflammatoire, la phosphorylation de STAT-1 est médiée par les protéines *Janus kinases* (JAKs) en réponse à la stimulation par les IFNs (Shuai and Liu, 2003). L'utilisation d'inhibiteurs des JAKs permettrait de déterminer si le maintien de la forme phosphorylée de STAT-1 est lié à une augmentation de sa phosphorylation ou à un défaut de déphosphorylation. Puisque l'infection par le VHC induit une libération d'IFNs de type I, la phosphorylation prolongée de STAT-1 pourrait être directement due à la stimulation autocrine continue des hépatocytes par les IFNs de type I. Dans ce cas, le blocage des récepteurs aux IFNs de type I par des anticorps monoclonaux permettrait de préciser le rôle des IFNs de type I dans la phosphorylation prolongée de STAT-1. Une hypothèse alternative à la stimulation continue par les IFNs de type I serait une dérégulation de l'expression des protéines SOCS, des inhibiteurs naturels des JAKs (Shuai and Liu, 2003). En faveur de cette hypothèse, il a été observé une inhibition de l'expression de SOCS-1 dans le foie de patients infectés par le VHC (Miyoshi et al., 2005; Yang et al., 2003). Cette inhibition de SOCS-1 pourrait être médiée par la protéine Core du VHC et/ou par la régulation épigénétique (hyperméthylation) du gène *SOCS-1* (Miyoshi et al., 2005; Yang et al., 2003). Dans les lymphocytes B, le blocage de SOCS-1 par la protéine Core s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de STAT-1 (Yao et al., 2008). Des expériences de surexpression et/ou de *silencing* de SOCS-1 pourraient permettre de préciser le rôle joué par cette protéine dans la phosphorylation prolongée de STAT-1 dans notre modèle.

IV. Rôle de IDO dans l'immunosuppression

Impact de l'expression hépatique de IDO sur les lymphocytes T

Bien que l'expression hépatique de IDO au cours de l'infection par le VHC ait été rapportée chez le chimpanzé et chez l'homme (Larrea et al. 2007; Rollier et al. 2007a), son impact sur l'immunité adaptative n'a jamais été exploré. Dans notre étude, nous montrons que l'expression hépatique de IDO diminue significativement la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ activés. Ce résultat suggère que les hépatocytes infectés par le VHC et placés dans un microenvironnement riche en IFN-γ sont capables d'exercer un rétrocontrôle négatif sur les lymphocytes T $CD4^+$. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le mécanisme par lequel IDO inhibe la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$. En particulier, une séparation des hépatocytes et des lymphocytes T $CD4^+$ en co-culture par des expériences de *transwell* (Vacca et al., 2010) permettrait de préciser si l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ est médiée par des facteurs solubles ou si elle nécessite un contact direct entre les lymphocytes T et les hépatocytes exprimant IDO. La restauration partielle de la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ en présence de 1-DL-MT dans notre modèle suggère néanmoins que la dérégulation de la réponse lymphocytaire T est avant tout liée à l'activité enzymatique de IDO sur le Try.

Les enzymes de la voie des kynurénines agissant en aval de la première étape catalysée par IDO sont fonctionnelles dans le foie (Takikawa et al., 1986). Par conséquent, l'activation hépatique de IDO au cours de l'hépatite C expose localement les lymphocytes T à une déplétion en Try et à l'accumulation d'une variété de kynurénines. Nous n'avons pas spécifiquement évalué l'impact respectif de la déplétion en Try et celui de l'accumulation des kynurénines sur la prolifération des lymphocytes T dans notre travail. Cependant, de précédentes études suggèrent que la dérégulation des lymphocytes T induite par IDO peut à la fois être médiée par la déplétion en Try et par l'accumulation des kynurénines. Par exemple, l'incubation de lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ dans un milieu pauvre en Try et en présence d'un cocktail de plusieurs kynurénines inhibe l'expression de la chaîne ζ des TCR et favorise l'orientation des lymphocytes T vers un phénotype régulateur (Fallarino et al., 2006). L'incubation de lymphocytes T avec certaines kynurénines comme l'acide 3 – hydroxyanthranilique et l'acide quinolinique est suffisante pour entrainer un dysfonctionnement, une anergie, voire même une apoptose des lymphocytes T activés (Fallarino et al., 2002; Terness et al., 2002). Des expériences de supplémentation en Try et/ou d'exposition des lymphocytes T aux kynurénines pourraient permettre de préciser le rôle joué par ces différents composés dans notre modèle.

L'épuisement de la réponse lymphocytaire T est une caractéristique de l'infection chronique par le VHC (Rehermann, 2013). Chez environ 2/3 des patients, cette insuffisance de la réponse immunitaire ne permet pas d'éliminer le virus, conduisant à l'instauration d'une hépatite C chronique. Nos résultats suggèrent que l'expression prolongée de IDO par les hépatocytes au cours de l'infection par le VHC pourrait jouer un rôle crucial dans l'altération de la réponse antivirale des lymphocytes T et favoriser la persistance du virus. Notre étude s'est focalisée avant tout sur les interactions entre les hépatocytes infectés et les lymphocytes T $CD4^+$ activés. D'autres populations cellulaires hépatiques pourraient également jouer un rôle important dans l'immunosuppression médiée par IDO. En particulier, les CPAs telles que les DCs et les macrophages sont abondamment présentes dans le foie (Crispe, 2009; Heydtmann, 2009) et peuvent exprimer IDO à des niveaux élevés (Mellor and Munn, 2004). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle central des DCs IDO^+ dans l'instauration et le maintien de la tolérance immunitaire périphérique (Belladonna et al., 2009; Mellor and Munn, 2004; Puccetti and Grohmann, 2007). Au cours de l'hépatite C chronique, les DCs ont une faible capacité d'activation des lymphocytes T et expriment des cytokines immunosuppressives qui favorisent l'immunotolérance (Lambotin et al., 2010). Les DCs provenant de patients chroniquement infectés par le VHC ont une expression plus élevée de IDO et induisent plus de lymphocytes Tregs *in vitro* que les DCs provenant de sujets sains (Higashitani et al., 2013). Des études d'immunohistochimie pourraient permettre de préciser si les DCs (et les autres CPAs) expriment IDO dans le foie chez les patients infectés par le VHC. Puisqu'une accumulation de lymphocytes Tregs est observée dans le foie au cours de l'hépatite C chronique (Cabrera et al., 2004; Sugimoto et al., 2003), l'impact de l'expression hépatique de IDO sur la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Tregs pourrait également être exploré par des expériences complémentaires de co-culture.

Rôle de IDO dans l'échappement immunitaire au cours des infections virales

Bien que IDO soit exprimée lors de nombreuses infections virales, seuls quelques virus comme le VHC, le VHB et le VIH parviennent à échapper au système immunitaire et à établir des infections chroniques (Byakwaga et al., 2014; Chen et al., 2009; Larrea et al., 2007). Dans d'autres infections comme la grippe, l'altération des réponses lymphocytaires Th1 et Th17 liée à l'activation de IDO n'est pas suffisante pour permettre au virus de persister dans l'organisme (Fox et al., 2013). Au sein de la famille des *Flaviviridae* dans laquelle plusieurs virus activent l'expression de IDO, seul le VHC établit des infections chroniques, tandis que les virus West Nile et de la dengue entrainent uniquement des infections aiguës (Becerra et al., 2009; Yeung et al., 2012). Ces observations suggèrent que l'impact de IDO sur l'évolution des infections virales est variable selon les virus impliqués.

Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ce constat. D'une part, il a été suggéré que l'effet « dominant » de IDO - antimicrobien ou immunorégulateur - serait variable en fonction de l'agent pathogène considéré (Divanovic et al., 2012). D'autre part, le niveau d'expression de IDO pourrait être plus élevé dans le cas du VIH, du VHC et du VHB que lors des autres infections virales, favorisant ainsi la persistance de ces virus. Une étude comparative des concentrations sériques de Kyn et de Try lors d'infections par différents virus pourrait aider à étayer cette hypothèse. Enfin, le site anatomique d'activation de IDO pourrait jouer un rôle important dans le devenir de l'infection. En effet, la réplication du VHC et du VHB se déroule dans le foie, tandis que les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses digestives et les ganglions mésentériques sont des sites importants de la réplication et de la persistance du VIH (Cumont et al., 2007). Le foie, les ganglions mésentériques et les organes lymphoïdes associés aux muqueuses digestives drainent respectivement le sang et la lymphe en provenance du tube digestif et sont confrontés en permanence à des motifs antigéniques étrangers provenant du microbiote intestinal. L'instauration d'une tolérance immunitaire périphérique dans le foie et dans les tissus lymphoïdes péri-intestinaux est indispensable au maintien de la symbiose entre les bactéries commensales et leur hôte et permet d'éviter une activation immunitaire permanente (Crispe, 2009; Eberl and Lochner, 2009). Par conséquent, le microenvironnement de ces organes est riche en cytokines immunosuppressives et en lymphocytes Tregs (Crispe, 2009). Le catabolisme du Try est également omniprésent dans ces organes, via l'expression de TDO et de IDO dans le foie et via l'activation « constitutive » de IDO dans les ganglions mésentériques (Onodera et al., 2009). Les pathogènes capables de se répliquer sur ces sites anatomiques « tolérogènes », tels que le VHC, le VHB et le VIH, pourraient ainsi profiter de l'action immunorégulatrice locale de IDO pour proliférer et échapper à la réponse immunitaire. En faveur de cette idée, il a été observé que la progression de l'infection par le SIV chez le macaque était corrélée à l'expression de IDO dans les ganglions mésentériques et dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses digestives (Cumont et al., 2007).

Certaines expériences de transplantations d'organes suggèrent également que l'impact global de IDO *in vivo* pourrait varier en fonction de son site anatomique d'expression. En effet, il a été observé que le blocage pharmacologique de IDO dans divers modèles de greffes de cornée, de peau ou de pancréas n'augmente pas significativement la vitesse de rejet du greffon, ce qui suggère que IDO ne joue qu'un rôle mineur dans la tolérance immunitaire périphérique au cours de ces allogreffes (Mulley and Nikolic-Paterson, 2008). A l'inverse, le blocage de IDO lors de greffes hépatiques chez la souris induit un rejet rapide du greffon (Pan et al., 2000), suggérant une place importante de IDO dans l'immunotolérance envers le nouveau foie. En faveur de cette idée, il a été observé que l'expression hépatique de IDO était induite lors des greffes hépatiques allogéniques mais pas lors des greffes syngéniques chez le rat (Pan et al., 2000). Cette activation hépatique de IDO pourrait

expliquer la tolérance immunitaire spontanée envers les foies allogreffés chez de nombreux modèles murins (Miki et al., 2001). Ainsi, l'expression de IDO pourrait avoir une place centrale dans la tolérance immunitaire hépatique. En induisant l'expression hépatique de IDO, le VHC pourrait bénéficier d'un environnement tolérogène favorable à son échappement immunitaire et à sa persistance.

V. Impact de IDO *in vivo*

Malgré les nombreuses preuves de l'effet antiviral de IDO *in vitro*, son impact *in vivo* est plus discuté. Certains auteurs ont suggéré que l'intensité de la déplétion en Try à atteindre pour bloquer la réplication des agents pathogènes *in vitro* avait peu de chance de survenir *in vivo* puisque les réserves locales de Try dans les tissus sont rapidement reconstituées par diffusion du Try à partir de tissus voisins ou par libération du Try par les cellules en apoptose (Moffett and Namboodiri, 2003). Pourtant, l'impact antimicrobien de IDO *in vivo* a été clairement établi lors d'infections par certains parasites comme *Toxoplasma gondii* (Divanovic et al., 2012; Silva et al., 2002) ou *Trypanosoma cruzi* (Knubel et al., 2010). L'infection aiguë de souris par *Toxoplasma gondii* active l'expression de IDO et entraine une diminution des concentrations en Try et une accumulation de kynurénines dans le sérum, les poumons et le système nerveux central (Silva et al., 2002). Le blocage génétique de l'IFN-γ ou de l'IRF-1 (souris IFN-$\gamma^{-/-}$ ou IRF-$1^{-/-}$) ou le blocage pharmacologique de IDO entraine une mortalité massive des souris quelques jours après l'infection par *Toxoplasma gondii*, suggérant un rôle crucial de l'axe IFN-γ-IRF-1-IDO dans la défense contre ce parasite *in vivo* (Divanovic et al., 2012; Silva et al., 2002).

L'impact de IDO sur l'évolution des infections *in vivo* semble extrêmement variable selon l'agent pathogène impliqué. En effet, si IDO contribue à la défense contre *Toxoplasma gondii* chez la souris, son expression dans le même modèle murin infecté par *Leishmania major* (l'agent de la leishmaniose cutanée) favorise au contraire l'échappement immunitaire et la persistance de l'infection (Divanovic et al., 2012). Dans cette même étude, l'inhibition de IDO chez des souris infectées par HSV-1 n'induisait pas d'impact visible sur la réplication virale ni sur la virulence de l'infection (Divanovic et al., 2012). Dans une autre étude, le blocage génétique ou pharmacologie de IDO chez des souris infectées par le virus de la leucémie murine LP-BM5 augmentait le nombre de pDCs et l'expression des IFNs de type I et supprimait la réplication virale. En conséquence, la survie des souris $IDO^{-/-}$ infectées par le virus LP-BM5 était significativement supérieure à la survie des souris sauvages (Hoshi et al., 2010). De la même manière, l'inhibition pharmacologique de IDO réduisait la réplication virale du VHB dans un modèle *in vivo* (Moheno et al., 2010). Ces observations indiquent que le rôle dominant de IDO – antimicrobien ou immunorégulateur – varie considérablement

selon l'agent pathogène impliqué. L'expression et l'impact de IDO vis-à-vis d'un même agent pathogène pourrait également varier significativement entre les hôtes de différentes espèces (Schmidt and Schultze, 2014), soulignant l'importance d'utiliser des modèles *in vivo* qui se rapprochent de la physiologie humaine et/ou de réaliser des études cliniques pour évaluer l'impact de IDO au cours des infections chez l'homme.

Dans le cas du VHC, l'expression hépatique de IDO est transitoirement augmentée en phase aiguë de l'infection chez les chimpanzés qui parviennent à éliminer le virus (Larrea et al., 2007). Cette observation supporte nos résultats *in vitro* et plaide en faveur du rôle de IDO dans la défense immunitaire contre le VHC en phase aiguë de l'infection, sans toutefois l'affirmer. Au cours de l'hépatite C chronique, le maintien de l'expression de IDO dans le foie des chimpanzés pourrait par contre favoriser l'immunotolérance et la persistance du VHC (Larrea et al., 2007; Rollier et al., 2007b). Le développement de modèles murins *IDO*$^{-/-}$ immunocompétents et supportant l'infection par le VHC constituerait un outil précieux pour évaluer l'impact antiviral réel de IDO sur le VHC *in vivo*.

VI. Place des inhibiteurs de IDO

Le blocage pharmacologique de IDO par le 1-MT dans notre modèle de co-culture restaurait partiellement la prolifération des lymphocytes T CD4$^+$ activés. Bien que des études *in vivo* soient nécessaires pour le confirmer, ce résultat suggère que les inhibiteurs pharmacologiques de IDO pourraient aider à restaurer une immunité antivirale efficace au cours de l'hépatite C chronique. A ce jour, plusieurs inhibiteurs de IDO sont en cours d'essais thérapeutiques de phases I ou II dans le traitement des cancers (Austin and Rendina, 2014). Des expérimentations précliniques suggèrent que les inhibiteurs de IDO pourraient également trouver leur place dans l'arsenal thérapeutique contre les infections virales. Dans un modèle murin d'encéphalite à VIH, l'administration de 1-MT contribuait à restaurer la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8$^+$ et permettait d'éliminer près de 90 % des macrophages infectés par le VIH (Potula et al., 2005). De la même manière, le 1-MT favorisait la clairance virale et la survie de souris infectées par le virus de la leucémie murine (Hoshi et al., 2010). Chez le macaque Rhesus, le 1-MT agissait en synergie avec les trithérapies antirétrovirales pour diminuer la réplication virale du SIV (Boasso et al., 2009).

Outre l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de IDO, d'autres stratégies ont été proposées pour diminuer l'expression et/ou l'activité de IDO au cours des infections virales. L'administration de vitamine B3 (niacine/ nicotinamide), un produit final de la voie des kynurénines, à des patients infectés par le VIH augmentait la concentration plasmatique de Try (Murray et al., 2001) et était associée à des taux plus élevés de lymphocytes T CD4$^+$

circulants, à une progression plus lente de la maladie et à une survie augmentée (Murray, 2003). Cette observation suggère l'existence d'un rétrocontrôle négatif des produits finaux de la voie des kynurénines sur le catabolisme du Try et laisse entrevoir une possible utilisation thérapeutique de ces molécules. L'engagement des corécepteurs CTLA-4 sur les corécepteurs CD80/CD86 des cellules dendritiques induit l'expression de IDO (Puccetti and Grohmann, 2007). Le blocage des co-récepteurs CTLA-4 par un anticorps monoclonal, l'Ipilimumab (Hodi et al., 2010), pourrait permettre de bloquer l'induction de IDO dans certaines situations pathologiques. Chez le macaque infecté par le SIV, l'association d'Ipilimumab au traitement antirétroviral diminuait l'expression de IDO et du TGF-β et augmentait l'efficacité de la réponse immunitaire antivirale médiée par les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Hryniewicz et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggère que les différents inhibiteurs de l'expression et/ou de l'activité de IDO contribuent à restaurer une réponse immunitaire antivirale au cours des infections chroniques. Des études précliniques et cliniques sont nécessaires pour préciser la place de ces inhibiteurs au cours de l'infection chronique par le VHC.

En plus de son rôle dans l'immunotolérance au cours des infections, l'expression de IDO pourrait diminuer la réponse immunitaire lors de la vaccination. Ainsi, l'expression de IDO a été associée à une diminution de l'efficacité de la vaccination anti-VHB dans une cohorte de patients hémodialysés (Eleftheriadis et al., 2011). Dans ce contexte, les inhibiteurs de IDO pourraient trouver leur place pour augmenter l'efficacité de vaccins prophylactiques et/ou thérapeutiques. Chez les souris immunisées par l'antigène HBs en présence d'α-galactosylcéramide (un agoniste des cellules NKT utilisé comme adjuvant), l'inhibition de IDO favorisait le développement de la réponse immunitaire adaptative anti-VHB (Ito et al., 2014). Dans une récente étude, l'immunogénicité d'un vaccin thérapeutique anti-SIV a été évaluée chez des macaques infectés par le SIV en présence de 1-MT, d'un anticorps anti-CTLA-4 et d'une trithérapie antirétrovirale. Contrairement à l'effet attendu, le blocage de IDO et du CTLA-4 n'augmentait pas la réponse immunitaire induite par le vaccin mais aggravait la toxicité des antirétroviraux, conduisant à des pancréatites et à des diabètes auto-immuns létaux pour les animaux (Vaccari et al., 2012). Ce résultat montre que les inhibiteurs de IDO, notamment en association avec d'autres molécules immunomodulatrices comme les anticorps anti-CTLA-4, peuvent induire des effets secondaires liés à leur impact sur l'immunotolérance *in vivo*. Le résultat des études cliniques actuellement menées avec le 1-MT permettra de préciser la toxicité réelle de cette molécule chez l'homme.

VII. Place de TDO et de IDO-2

En plus de IDO-1, deux autres enzymes sont responsables de la dégradation du Try chez l'homme : TDO et IDO-2, l'enzyme paralogue de IDO-1 (Ball et al., 2014). Nous n'avons pas détecté d'expression de IDO-2 dans les hépatocytes infectés par le VHC au cours de notre étude. A ce jour, le rôle joué par IDO-2 chez l'homme reste mal connu. Compte tenu de sa faible affinité pour le L-Try par rapport à IDO-1, certains auteurs ont suggéré que le rôle de IDO-2 chez l'homme et les vertébrés supérieurs pourrait être indépendant de son activité enzymatique (Pantouris et al., 2014). A l'inverse, il a également été suggéré que IDO-2 aurait conservé une activité enzymatique biologiquement pertinente sur le Try au cours de l'évolution, mais que cette activité pourrait être limitée à certains types cellulaires et/ou à certaines circonstances physiologiques ou pathologiques. En faveur de cette idée, il a été observé que la chimiokine CXCL11 induisait à la fois l'expression de IDO-2 et l'augmentation des concentrations en L-Kyn *in vitro* dans des cellules issues de carcinomes baso-cellulaires (Lo et al., 2011). *In vivo*, l'expression de IDO-2 a été mise en évidence sur le site tumoral au cours des cancers gastriques, coliques, rénaux et pancréatiques (Löb et al., 2009; Witkiewicz et al., 2009). De plus, des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de IDO-2 et possédant des propriétés anti-tumorales ont été observés chez des patients atteints de cancers du rein ou de mélanomes (Sørensen et al., 2011). L'ensemble de ces résultats plaide en faveur d'une activation de IDO-2 durant certains cancers. Le récent développement de souris IDO-$2^{-/-}$ a permis de proposer un rôle de IDO-2 distinct de celui de IDO-1 lors de la réponse inflammatoire (Metz et al., 2014). En utilisant un modèle murin d'hypersensibilité de contact pour évaluer les différences d'immunorégulation entre des souris sauvages, IDO-$1^{-/-}$ et IDO-$2^{-/-}$, Metz *et al.* ont montré que IDO-2 était nécessaire à l'induction de plusieurs cytokines importantes dans la réponse inflammatoire et non affectées par la délétion de *IDO-1*, dont l'IFN-γ, le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), le TNF-α et l'IL-6 (Metz et al., 2014). A ce jour, aucune étude clinique ou épidémiologique à grande échelle n'a pu corréler l'activation de IDO-2 avec une pathologie particulière. Le rôle joué par IDO-2 au cours des infections virales reste donc à préciser.

TDO est constitutivement exprimée dans le foie et joue un rôle important dans l'homéostasie du Try (Forouhar et al., 2007). Il a été montré que des cellules exprimant une protéine TDO recombinante d'origine humaine pouvaient bloquer la croissance de certains microorganismes comme *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii* et HSV et pouvaient inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T *in vitro* (Schmidt et al., 2009). Cette observation suggère que TDO pourrait jouer un rôle antimicrobien et/ou immunorégulateur au cours des infections. Lors d'une récente étude, Bessede *et al.* ont observé que TDO (mais pas IDO-1 ni IDO-2) était impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire *in vivo* lorsque des souris étaient stimulées pour la première fois par du LPS. Par contre, une

deuxième stimulation par le LPS déclenchait un état de « tolérance aux endotoxines » médié cette fois par la phosphorylation de IDO-1 dans les DCs $CD11c^+$. La phosphorylation de IDO-1 était dépendante de l'AhR et aboutissait à la production de TGF-β (Bessede et al., 2014). Cette étude offre un regard nouveau sur la complémentarité entre TDO et IDO-1 dans la régulation de la réponse inflammatoire et sur l'importance de la phosphorylation de IDO-1 dans les processus biologiques. Nous n'avons pas évalué l'expression hépatocytaire de TDO au cours de l'infection par le VHC. Cependant, puisque l'expression de TDO n'est pas inductible par l'IFN-γ et n'est pas bloquée par le 1-DL-MT, nos résultats *in vitro* suggèrent avant tout un rôle de IDO-1 dans la défense antivirale et l'immunorégulation au cours de l'hépatite C.

VIII. Vers un impact plus large de IDO au cours de l'hépatite C

En plus de son rôle dans la régulation de l'inflammation et des infections, IDO est suspectée de participer à de nombreux processus pathologiques incluant l'échappement tumoral à l'immunosurveillance (Godin-Ethier et al., 2011), certains désordres auto-immuns (Scott et al., 2009) ou métaboliques (Oxenkrug, 2010) et les troubles de l'humeur (Campbell et al., 2014a). Or, l'évolution de l'hépatite C chronique est marquée par le risque de survenue de carcinomes hépatocellulaires, de désordres métaboliques, de pathologies auto-immunes et de syndromes dépressifs (2013). Puisque l'expression de IDO est activée au cours de l'hépatite C chronique, il convient de s'interroger sur le rôle joué par IDO dans la genèse de ces manifestations.

Troubles de l'humeur

De nombreux arguments plaident en faveur du rôle de l'inflammation dans la survenue des troubles de l'humeur (Dantzer et al., 2008b). Le métabolisme du Try, via la synthèse de sérotonine (Berger et al., 2009), de mélatonine ou de kynurénines (Campbell et al., 2014a) est également directement lié à la régulation de l'humeur. La relation entre catabolisme du Try, réponse inflammatoire et dépression a été bien caractérisée dans des modèles animaux. Par exemple, les souris infectées par du bacille de Calmette et Guérin (O'Connor et al., 2009b) ou qui reçoivent des injections de LPS (O'Connor et al., 2009c) développent des syndromes dépressifs associés à une activation de l'expression de IDO. Le blocage pharmacologique de IDO par le 1-MT prévient le développement des symptômes dépressifs dans ces modèles murins (O'Connor et al., 2009b, 2009c). Au cours de l'hépatite C, jusqu'à 50 % des patients traités par l'IFN-α développent des symptômes dépressifs qui persistent

pendant toute la durée du traitement et subsistent pendant une courte période à l'arrêt du traitement (Bonaccorso et al., 2002a). Une augmentation significative du ratio des concentrations sériques Kyn/Try, témoin d'une activation de IDO, a été constatée chez les patients infectés par le VHC et traités par l'IFN-α (Bonaccorso et al., 2002b; Capuron et al., 2003). Cette observation suggère que l'expression de IDO et l'inflammation systémique générées par le VHC et l'IFN-α pourraient faire le lit des troubles de l'humeur chez ces patients. En faveur de l'implication de IDO dans ce contexte, il a récemment été observé qu'un polymorphisme sur le promoteur de *IDO-1* est associé à une plus grande sévérité des symptômes dépressifs induits par l'IFN-α chez les patients caucasiens chroniquement infectés par le VHC (Smith et al., 2012). Des études supplémentaires sont donc à mener pour préciser le rôle de IDO dans les symptômes dépressifs constatés chez ces patients et évaluer le bénéfice éventuel des inhibiteurs pharmacologiques de IDO au cours du traitement par l'IFN-α.

Désordres métaboliques et pathologies auto-immunes

Les patients chroniquement infectés par le VHC présentent des perturbations métaboliques telles qu'une insulino-résistance (Romero-Gómez, 2006), un diabète de type 2 (Mehta et al., 2003), ou un syndrome métabolique (Sheikh et al., 2008). Dans une récente cohorte de patients chroniquement infectés par le VHC, l'expression de IDO était significativement associée à la survenue d'une insulino-résistance (Oxenkrug et al., 2013), ce qui suggère que l'expression de IDO pourrait être impliquée dans les désordres métaboliques associés au VHC. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Carcinome hépatocellulaire

Les patients chroniquement infectés par le VHC sont à risque de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Tsai and Chung, 2010). Le CHC représente le 5ème cancer le plus fréquent chez l'homme (le 7ème chez la femme) et la 2ème cause de mortalité par cancer dans le monde (El-Serag, 2012; Ferlay et al., 2015). Dans environ 80 % des cas, les CHC sont associés à des infections chroniques par le VHC ou le VHB (El-Serag, 2012). Les mécanismes impliqués dans la carcinogénèse au cours de l'infection par le VHC sont mal compris. L'inflammation chronique, la dérégulation des voies de signalisation cellulaire induite par les protéines virales et les mécanismes s'échappement à l'immunosurveillance sont probablement des éléments clés conduisant à l'initiation et à la promotion des CHC au cours de l'hépatite C (Tsai and Chung, 2010). La tolérance immunitaire médiée par IDO dans un contexte d'inflammation chronique pourrait faire le lit du développement de cancers. Il a

notamment été montré que le phorbol myristate acétate (PMA), un agoniste de la protéine kinase C capable de stimuler l'inflammation et de favoriser la survenue de cancers *in vivo*, induit la production de IDO dans les pDCs des ganglions périphériques. En retour, l'expression de IDO par les pDCs bloque l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Chez les souris *knock-out* pour le gène *IDO-1*, l'impact carcinogène du PMA est considérablement diminué, ce qui suggère que IDO joue un rôle clé dans la carcinogénèse *in vivo* (Muller et al., 2008). IDO est exprimée durant les CHC (Ishio et al., 2004; Pan et al., 2008). Dans une cohorte de 138 patients atteints d'un CHC, l'expression de IDO mesurée par immunohistochimie sur le site tumoral était associée à la survenue de métastases et inversement corrélée à la survie (Pan et al., 2008). Lors des CHC, l'expression de IDO est observée à la fois dans les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement (Ishio et al., 2004; Pan et al., 2008). Les fibroblastes issus du microenvironnement des CHC altèrent l'activation et le fonctionnement des cellules NK via l'action combinée de IDO et de la prostaglandine E2, conduisant *in fine* à une diminution de la cytotoxicité des cellules NK et de la production de cytokines pro-inflammatoires (Li et al., 2012). Très récemment, une nouvelle sous-population de DCs exprimant les marqueurs $CD14^{+}CD11b^{high}CTLA\text{-}4^{+}$ a été mise en évidence chez les patients atteints de CHC. Cette sous-population de DCs était présente sur le site tumoral et représentait environ 13 % des cellules mononucléées du sang périphérique. De manière intéressante, ces DCs $CD14^{+}CTLA4^{+}$ inhibaient la prolifération des lymphocytes T $CD4^{+}$ et favorisaient leur apoptose *in vitro* via la production d'un niveau élevé de IDO et d'IL-10. L'ajout de 1-MT dans le milieu réactionnel restaurait presque entièrement la prolifération des lymphocytes T $CD4^{+}$, suggérant que IDO est un acteur clé dans l'immunosuppression médiée par les DCs $CD14^{+}CTLA\text{-}4^{+}$ au cours des CHC (Han et al., 2014). L'ensemble de ces arguments plaide en faveur d'un rôle de IDO dans la carcinogénèse hépatique au cours de l'infection par le VHC. La place des inhibiteurs de IDO dans ce contexte pourrait être précisée par des études cliniques.

CONCLUSION

L'échappement du VHC au système immunitaire conduit à la persistance virale chez plus de deux tiers des patients. En plus des mécanismes développés par le VHC pour contourner la réponse immunitaire, des facteurs de l'hôte pourraient favoriser la persistance du virus dans l'organisme. La protéine IDO est activée lors de nombreuses infections virales au cours desquelles elle est suspectée de participer à la fois aux mécanismes de défense de l'hôte et à l'immunosuppression. L'expression de IDO est augmentée chez les patients chroniquement infectés par le VHC (Higashitani et al., 2013; Larrea et al., 2007). Chez les chimpanzés infectés par le VHC, les ARNm de IDO sont rapidement détectables dans le foie et persistent tout au long de la phase chronique de l'infection (Larrea et al., 2007; Rollier et al., 2007b), suggérant une implication de IDO dans la pathogénèse de l'hépatite C.

Au cours de ce travail, nous avons souhaité préciser la place des hépatocytes dans l'expression hépatique de IDO au cours de l'hépatite C, déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de IDO par le VHC et évaluer l'impact de IDO sur la réplication du VHC et sur la réponse immunitaire antivirale.

Nous avons démontré que l'infection par le VHC stimule l'expression de IDO dans les hépatocytes. L'enzyme produite est fonctionnellement active, capable de dégrader le Try en Kyn. L'expression de IDO par les hépatocytes est encore accrue lorsque les hépatocytes sont soumis à la fois à l'infection par le VHC et à la présence d'IFN-γ provenant des lymphocytes T activés situés dans leur microenvironnement. La stimulation de IDO dans les hépatocytes infectés par le VHC est médiée par l'activation du facteur de transcription IRF-1 et potentialisée par le maintien d'un état phosphorylé de STAT-1 induit par le VHC.

Nous avons observé que l'expression de IDO par les hépatocytes infectés est contemporaine du déclenchement de la réponse antivirale innée et que IDO inhibe partiellement la réplication du VHC. Nous avons également montré que IDO est impliquée dans l'effet antiviral de l'IFN-α sur le VHC. En plus de cette action antivirale sur le VHC, l'expression de IDO par les hépatocytes inhibe la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ activés situés à proximité, ce qui suggère un rôle immunosuppresseur de IDO au cours de l'infection par le VHC.

Nous avons donc identifié un double rôle de l'IDO hépatique au cours de l'infection par le VHC : la défense antivirale et l'immunorégulation. Au cours de la phase aiguë, l'expression de IDO pourrait contribuer au contrôle de l'infection en ralentissant la réplication du VHC.

Au cours d'une phase plus tardive, lorsque les lymphocytes T anti-VHC s'accumulent dans le foie et que le microenvironnement devient riche en IFN-γ, l'expression accrue de IDO dans les hépatocytes infectés par le VHC pourrait contre-réguler la réponse antivirale des lymphocytes T et favoriser la tolérance immunitaire. Il est possible que ce mécanisme permette de protéger les hépatocytes contre une possible réponse exagérée des lymphocytes T et évite ainsi la survenue d'une cytolyse massive. La rareté des hépatites fulminantes liées au VHC plaide en faveur de l'efficacité d'un tel système chez l'homme (Maheshwari et al., 2008). La contrepartie de l'expression hépatique de IDO est l'atténuation de la réponse cellulaire adaptative qui risque d'entraver la clairance virale. Ainsi, l'expression hépatique de IDO pourrait être bénéfique à l'hôte durant la phase aiguë puis délétère au cours de la phase chronique. Un modèle similaire a été proposé pour certaines infections bactériennes par Müller *et al.* (Müller et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs ont observé que la concentration minimale de Try nécessaire à la croissance bactérienne était 10 à 40 fois plus élevée que la concentration minimale nécessaire à l'activation des lymphocytes T. Ce résultat suggère que la déplétion en Try impacterait d'abord la prolifération microbienne. Puis, lorsque les concentrations en Try continuent à descendre, la réponse cellulaire T serait à son tour touchée par l'effet métabolique de IDO.

Des études supplémentaires pourraient permettre de déterminer le rôle des autres cellules du foie, en particulier les CPAs, dans l'expression hépatique de IDO au cours de l'infection par le VHC. Il serait également intéressant de préciser *in vitro* les modalités d'activation de IRF-1 et du maintien de la phosphorylation de STAT-1 induits par le VHC dans les hépatocytes. L'influence de l'expression hépatique de IDO sur la différenciation et la fonctionnalité des lymphocytes T pourrait être évaluée par des modèles supplémentaires de co-culture. Enfin, la compréhension des rôles successifs joués par IDO dans la progression de l'infection par le VHC pourrait être facilitée par le développement de modèles murins immunocompétents, *knock-out* pour le gène *IDO-1* et permissifs pour le VHC.

Le blocage de l'action immunorégulatrice de IDO au cours de l'infection chronique par le VHC pourrait permettre de restaurer une réponse immunitaire efficace contre le virus et faciliter la clairance virale. Des inhibiteurs pharmacologiques de IDO ont été développés et sont actuellement en cours d'essais thérapeutiques dans le traitement des cancers. Des études précliniques puis cliniques pourraient permettre de préciser la place de ces inhibiteurs de IDO dans l'arsenal thérapeutique et dans les stratégies vaccinales contre le virus de l'hépatite C.

REFERENCES

Abbate, I., Romano, M., Longo, R., Cappiello, G., Lo Iacono, O., Di Marco, V., Paparella, C., Spano, A., and Capobianchi, M.R. (2003). Endogenous levels of mRNA for IFNs and IFN-related genes in hepatic biopsies of chronic HCV-infected and non-alcoholic steatohepatitis patients. J. Med. Virol. *70*, 581–587.

Adams, O., Besken, K., Oberdörfer, C., MacKenzie, C.R., Takikawa, O., and Däubener, W. (2004a). Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. J. Virol. *78*, 2632–2636.

Adams, O., Besken, K., Oberdörfer, C., MacKenzie, C.R., Rüssing, D., and Däubener, W. (2004b). Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. Microbes Infect. Inst. Pasteur *6*, 806–812.

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B., and Zhang, Q.X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 12766–12771.

Alexander, A.M., Crawford, M., Bertera, S., Rudert, W.A., Takikawa, O., Robbins, P.D., and Trucco, M. (2002). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. Diabetes *51*, 356–365.

Almeida, A.S., Lago, P.M., Boechat, N., Huard, R.C., Lazzarini, L.C.O., Santos, A.R., Nociari, M., Zhu, H., Perez-Sweeney, B.M., Bang, H., et al. (2009). Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 718–731.

Alter, H.J., and Houghton, M. (2000). Clinical Medical Research Award. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. Nat. Med. *6*, 1082–1086.

André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Bréchot, C., Paranhos-Baccalà, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. J. Virol. *76*, 6919–6928.

Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. PLoS Pathog. *4*, e1000035.

Arnaud, N., Dabo, S., Akazawa, D., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Hugon, J., Wakita, T., and Meurs, E.F. (2011). Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. PLoS Pathog. *7*, e1002289.

Astigiano, S., Morandi, B., Costa, R., Mastracci, L., D'Agostino, A., Ratto, G.B., Melioli, G., and Frumento, G. (2005). Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. Neoplasia N. Y. N *7*, 390–396.

Austin, C.J.D., and Rendina, L.M. (2014). Targeting key dioxygenases in tryptophan-kynurenine metabolism for immunomodulation and cancer chemotherapy. Drug Discov. Today.

Baban, B., Chandler, P.R., Sharma, M.D., Pihkala, J., Koni, P.A., Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2009). IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 2475–2483.

Bakmiwewa, S.M., Fatokun, A.A., Tran, A., Payne, R.J., Hunt, N.H., and Ball, H.J. (2012). Identification of selective inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase 2. Bioorg. Med. Chem. Lett. *22*, 7641–7646.

Balachandran, V.P., Cavnar, M.J., Zeng, S., Bamboat, Z.M., Ocuin, L.M., Obaid, H., Sorenson, E.C., Popow, R., Ariyan, C., Rossi, F., et al. (2011). Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. Nat. Med. *17*, 1094–1100.

Ball, H.J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C.J.D., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J.A., Stocker, R., Jermiin, L.S., and Hunt, N.H. (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. Gene *396*, 203–213.

Ball, H.J., Jusof, F.F., Bakmiwewa, S.M., Hunt, N.H., and Yuasa, H.J. (2014). Tryptophan-catabolizing enzymes - party of three. Front. Immunol. *5*, 485.

Barnes, E., Folgori, A., Capone, S., Swadling, L., Aston, S., Kurioka, A., Meyer, J., Huddart, R., Smith, K., Townsend, R., et al. (2012). Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. Sci. Transl. Med. *4*, 115ra1.

Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2005). Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 9739–9740.

Bartenschlager, R., Frese, M., and Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. Adv. Virus Res. *63*, 71–180.

Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. Trends Microbiol. *19*, 95–103.

Barth, H., and Raghuraman, S. (2014). Persistent infectious diseases say - IDO. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in disease pathogenesis and implications for therapy. Crit. Rev. Microbiol. *40*, 360–368.

Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., et al. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. J. Biol. Chem. *278*, 41003–41012.

Barth, H., Rybczynska, J., Patient, R., Choi, Y., Sapp, R.K., Baumert, T.F., Krawczynski, K., and Liang, T.J. (2011). Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees. Hepatol. Baltim. Md *54*, 1135–1148.

Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003a). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. J. Exp. Med. *197*, 633–642.

Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.-C., Granier, C., Engle, R.E., Blackwelder, W.C., Emerson, S.U., Cosset, F.-L., and Purcell, R.H. (2003b). In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 14199–14204.

Bassett, S.E., Guerra, B., Brasky, K., Miskovsky, E., Houghton, M., Klimpel, G.R., and Lanford, R.E. (2001). Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. Hepatol. Baltim. Md *33*, 1479–1487.

Bauer, T.M., Jiga, L.P., Chuang, J.-J., Randazzo, M., Opelz, G., and Terness, P. (2005). Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *18*, 95–100.

Beadle, G.W., Mitchell, H.K., and Nyc, J.F. (1947). Kynurenine as an Intermediate in the Formation of Nicotinic Acid from Tryptophane by Neurospora. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *33*, 155–158.

Becerra, A., Warke, R.V., Xhaja, K., Evans, B., Evans, J., Martin, K., de Bosch, N., Rothman, A.L., and Bosch, I. (2009). Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. J. Gen. Virol. *90*, 810–817.

Belladonna, M.L., Volpi, C., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Pallotta, M.T., Boon, L., Gizzi, S., Fioretti, M.C., Grohmann, U., et al. (2008). Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 5194–5198.

Belladonna, M.L., Orabona, C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2009). TGF-beta and kynurenines as the key to infectious tolerance. Trends Mol. Med. *15*, 41–49.

Bellmann-Weiler, R., Schroecksnadel, K., Holzer, C., Larcher, C., Fuchs, D., and Weiss, G. (2008). IFN-gamma mediated pathways in patients with fatigue and chronic active Epstein Barr virus-infection. J. Affect. Disord. *108*, 171–176.

Bellmann-Weiler, R., Martinz, V., Kurz, K., Engl, S., Feistritzer, C., Fuchs, D., Rupp, J., Paldanius, M., and Weiss, G. (2010). Divergent modulation of Chlamydia pneumoniae infection cycle in human monocytic and endothelial cells by iron, tryptophan availability and interferon gamma. Immunobiology *215*, 842–848.

Berger, M., Gray, J.A., and Roth, B.L. (2009). The expanded biology of serotonin. Annu. Rev. Med. *60*, 355–366.

Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M.T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., Bicciato, S., Mazza, E.M.C., Macchiarulo, A., Vacca, C., et al. (2014). Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. Nature *511*, 184–190.

Bissig, K.-D., Wieland, S.F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T.T., Chisari, F.V., and Verma, I.M. (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. J. Clin. Invest. *120*, 924–930.

Bitzegeio, J., Bankwitz, D., Hueging, K., Haid, S., Brohm, C., Zeisel, M.B., Herrmann, E., Iken, M., Ott, M., Baumert, T.F., et al. (2010). Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. PLoS Pathog. *6*, e1000978.

Blackham, S., Baillie, A., Al-Hababi, F., Remlinger, K., You, S., Hamatake, R., and McGarvey, M.J. (2010). Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus. J. Virol. *84*, 5404–5414.

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. J. Virol. *80*, 6964–6972.

Blight, K.J., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. J. Virol. *76*, 13001–13014.

Blight, K.J., McKeating, J.A., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2003). Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. J. Virol. *77*, 3181–3190.

Boasso, A., Vaccari, M., Fuchs, D., Hardy, A.W., Tsai, W.-P., Tryniszewska, E., Shearer, G.M., and Franchini, G. (2009). Combined effect of antiretroviral therapy and blockade of IDO in SIV-infected rhesus macaques. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 4313–4320.

Bodaghi, B., Goureau, O., Zipeto, D., Laurent, L., Virelizier, J.L., and Michelson, S. (1999). Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 957–964.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. Annu. Rev. Immunol. *15*, 749–795.

Bolacchi, F., Sinistro, A., Ciaprini, C., Demin, F., Capozzi, M., Carducci, F.C., Drapeau, C.M.J., Rocchi, G., and Bergamini, A. (2006). Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. Clin. Exp. Immunol. *144*, 188–196.

Bonaccorso, S., Marino, V., Biondi, M., Grimaldi, F., Ippoliti, F., and Maes, M. (2002a). Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. J. Affect. Disord. *72*, 237–241.

Bonaccorso, S., Marino, V., Puzella, A., Pasquini, M., Biondi, M., Artini, M., Almerighi, C., Verkerk, R., Meltzer, H., and Maes, M. (2002b). Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. J. Clin. Psychopharmacol. *22*, 86–90.

Bradley, D.W., Maynard, J.E., Popper, H., Cook, E.H., Ebert, J.W., McCaustland, K.A., Schable, C.A., and Fields, H.A. (1983). Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. J. Infect. Dis. *148*, 254–265.

Brandacher, G., Perathoner, A., Ladurner, R., Schneeberger, S., Obrist, P., Winkler, C., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Weiss, H.G., Göbel, G., et al. (2006). Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *12*, 1144–1151.

Brzezinski, A. (1997). Melatonin in humans. N. Engl. J. Med. *336*, 186–195.

Von Bubnoff, D., Scheler, M., Wilms, H., Wenzel, J., von Bubnoff, N., Häcker, G., Schultze, J., Popov, A., Racz, P., Bieber, T., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing myeloid dendritic cells and macrophages in infectious and noninfectious cutaneous granulomas. J. Am. Acad. Dermatol. *65*, 819–832.

Bukh, J. (2004). A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. Hepatol. Baltim. Md *39*, 1469–1475.

Burbelo, P.D., Dubovi, E.J., Simmonds, P., Medina, J.L., Henriquez, J.A., Mishra, N., Wagner, J., Tokarz, R., Cullen, J.M., Iadarola, M.J., et al. (2012). Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. J. Virol. *86*, 6171–6178.

Burdeinick-Kerr, R., Govindarajan, D., and Griffin, D.E. (2009). Noncytolytic clearance of sindbis virus infection from neurons by gamma interferon is dependent on Jak/STAT signaling. J. Virol. *83*, 3429–3435.

Burkin, D.J., Kimbro, K.S., Barr, B.L., Jones, C., Taylor, M.W., and Gupta, S.L. (1993). Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. Genomics *17*, 262–263.

Byakwaga, H., Boum, Y., 2nd, Huang, Y., Muzoora, C., Kembabazi, A., Weiser, S.D., Bennett, J., Cao, H., Haberer, J.E., Deeks, S.G., et al. (2014). The Kynurenine Pathway of Tryptophan Catabolism, CD4+ T-Cell Recovery, and Mortality Among HIV-Infected Ugandans Initiating Antiretroviral Therapy. J. Infect. Dis.

Byrne, G.I., Lehmann, L.K., and Landry, G.J. (1986). Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells. Infect. Immun. *53*, 347–351.

Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R.J., Rosen, H.R., Liu, C., and Nelson, D.R. (2004). An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. Hepatol. Baltim. Md *40*, 1062–1071.

Campbell, B.M., Charych, E., Lee, A.W., and Möller, T. (2014a). Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. Front. Neurosci. *8*, 12.

Campbell, B.M., Charych, E., Lee, A.W., and Möller, T. (2014b). Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. Front. Neurosci. *8*, 12.

Capece, L., Lewis-Ballester, A., Yeh, S.-R., Estrin, D.A., and Marti, M.A. (2012). Complete reaction mechanism of indoleamine 2,3-dioxygenase as revealed by QM/MM simulations. J. Phys. Chem. B *116*, 1401–1413.

Capuron, L., Neurauter, G., Musselman, D.L., Lawson, D.H., Nemeroff, C.B., Fuchs, D., and Miller, A.H. (2003). Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. Biol. Psychiatry *54*, 906–914.

Chaves, A.C., Cerávolo, I.P., Gomes, J.A., Zani, C.L., Romanha, A.J., and Gazzinelli, R.T. (2001). IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of Toxoplasma gondii replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma. Eur. J. Immunol. *31*, 333–344.

Chayama, K., and Hayes, C.N. (2011). Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. J. Gastroenterol. Hepatol. *26 Suppl 1*, 83–95.

Cheent, K., and Khakoo, S.I. (2011). Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. Gut *60*, 268–278.

Chen, Y.-B., Li, S.-D., He, Y.-P., Shi, X.-J., Chen, Y., and Gong, J.-P. (2009). Immunosuppressive effect of IDO on T cells in patients with chronic hepatitis B*. Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol. *39*, 463–468.

Chevaliez, S. (2011). Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *17*, 116–121.

Chon, S.Y., Hassanain, H.H., and Gupta, S.L. (1996). Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. J. Biol. Chem. *271*, 17247–17252.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science *244*, 359–362.

Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., and Randall, G. (2009). RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. PLoS Pathog. *5*, e1000702.

Copeland, C.S., Neale, S.A., and Salt, T.E. (2013). Actions of Xanthurenic acid, a putative endogenous Group II metabotropic glutamate receptor agonist, on sensory transmission in the thalamus. Neuropharmacology *66*, 133–142.

Cox, A.L., Netski, D.M., Mosbruger, T., Sherman, S.G., Strathdee, S., Ompad, D., Vlahov, D., Chien, D., Shyamala, V., Ray, S.C., et al. (2005a). Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *40*, 951–958.

Cox, A.L., Mosbruger, T., Lauer, G.M., Pardoll, D., Thomas, D.L., and Ray, S.C. (2005b). Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. Hepatol. Baltim. Md *42*, 104–112.

Criado, G., Simelyte, E., Inglis, J.J., Essex, D., and Williams, R.O. (2009). Indoleamine 2,3 dioxygenase-mediated tryptophan catabolism regulates accumulation of Th1/Th17 cells in the joint in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. *60*, 1342–1351.

Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. Annu. Rev. Immunol. *27*, 147–163.

Cumont, M.C., Monceaux, V., Viollet, L., Lay, S., Parker, R., Hurtrel, B., and Estaquier, J. (2007). TGF-beta in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus. Cell Death Differ. *14*, 1747–1758.

Curti, A., Trabanelli, S., Onofri, C., Aluigi, M., Salvestrini, V., Ocadlikova, D., Evangelisti, C., Rutella, S., De Cristofaro, R., Ottaviani, E., et al. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells. Haematologica *95*, 2022–2030.

Dahari, H., Feinstone, S.M., and Major, M.E. (2010). Meta-analysis of hepatitis C virus vaccine efficacy in chimpanzees indicates an importance for structural proteins. Gastroenterology *139*, 965–974.

Dai, W., and Gupta, S.L. (1990). Molecular cloning, sequencing and expression of human interferon-gamma-inducible indoleamine 2,3-dioxygenase cDNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. *168*, 1–8.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., and Kelley, K.W. (2008a). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 46–56.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., and Kelley, K.W. (2008b). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 46–56.

Darcy, C.J., Davis, J.S., Woodberry, T., McNeil, Y.R., Stephens, D.P., Yeo, T.W., and Anstey, N.M. (2011). An observational cohort study of the kynurenine to tryptophan ratio in sepsis: association with impaired immune and microvascular function. PloS One *6*, e21185.

Däubener, W., Wanagat, N., Pilz, K., Seghrouchni, S., Fischer, H.G., and Hadding, U. (1994). A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. J. Immunol. Methods *168*, 39–47.

David, P., Viollon, C., Alexandre, E., Azimzadeh, A., Nicod, L., Wolf, P., Jaeck, D., Boudjema, K., and Richert, L. (1998). Metabolic capacities in cultured human hepatocytes obtained by a new isolating procedure from non-wedge small liver biopsies. Hum. Exp. Toxicol. *17*, 544–553.

Davis, J.M., and Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. Cell *136*, 37–49.

Desvignes, L., and Ernst, J.D. (2009). Interferon-gamma-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to Mycobacterium tuberculosis. Immunity *31*, 974–985.

Divanovic, S., Sawtell, N.M., Trompette, A., Warning, J.I., Dias, A., Cooper, A.M., Yap, G.S., Arditi, M., Shimada, K., Duhadaway, J.B., et al. (2012). Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection. J. Infect. Dis. *205*, 152–161.

Domingo, E., and Gomez, J. (2007). Quasispecies and its impact on viral hepatitis. Virus Res. *127*, 131–150.

Domingo, E., Sheldon, J., and Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *76*, 159–216.

Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., et al. (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. Nature *474*, 208–211.

Dorner, M., Horwitz, J.A., Donovan, B.M., Labitt, R.N., Budell, W.C., Friling, T., Vogt, A., Catanese, M.T., Satoh, T., Kawai, T., et al. (2013). Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. Nature *501*, 237–241.

Drane, D., Maraskovsky, E., Gibson, R., Mitchell, S., Barnden, M., Moskwa, A., Shaw, D., Gervase, B., Coates, S., Houghton, M., et al. (2009). Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX vaccine: a phase I study in healthy volunteers. Hum. Vaccin. *5*, 151–157.

Drexler, J.F., Corman, V.M., Müller, M.A., Lukashev, A.N., Gmyl, A., Coutard, B., Adam, A., Ritz, D., Leijten, L.M., van Riel, D., et al. (2013). Evidence for novel hepaciviruses in rodents. PLoS Pathog. *9*, e1003438.

Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2014). Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle - An update. J. Hepatol. *61*, S3–S13.

Eberl, G., and Lochner, M. (2009). The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. Mucosal Immunol. *2*, 478–485.

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

Eleftheriadis, T., Liakopoulos, V., Antoniadi, G., Stefanidis, I., and Galaktidou, G. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is increased in hemodialysis patients and affects immune response to hepatitis B vaccination. Vaccine *29*, 2242–2247.

Elmowalid, G.A., Qiao, M., Jeong, S.-H., Borg, B.B., Baumert, T.F., Sapp, R.K., Hu, Z., Murthy, K., and Liang, T.J. (2007). Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 8427–8432.

El-Serag, H.B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology *142*, 1264–1273.e1.

Erickson, A.L., Kimura, Y., Igarashi, S., Eichelberger, J., Houghton, M., Sidney, J., McKinney, D., Sette, A., Hughes, A.L., and Walker, C.M. (2001). The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. Immunity *15*, 883–895.

Esteban, J.I., López-Talavera, J.C., Genescà, J., Madoz, P., Viladomiu, L., Muñiz, E., Martin-Vega, C., Rosell, M., Allende, H., and Vidal, X. (1991). High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. Ann. Intern. Med. *115*, 443–449.

European Association for the Study of the Liver (2011). EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. J. Hepatol. *55*, 245–264.

European Association for the Study of the Liver (2014). EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2014. J. Hepatol. *61*, 373–395.

Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatziioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature *446*, 801–805.

Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Soulier, E., Carolla, P., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., Patel, A.H., Cosset, F.-L., Pessaux, P., Doffoël, M., et al. (2010). Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. J. Exp. Med. *207*, 2019–2031.

Fafi-Kremer, S., Fauvelle, C., Felmlee, D.J., Zeisel, M.B., Lepiller, Q., Fofana, I., Heydmann, L., Stoll-Keller, F., and Baumert, T.F. (2012). Neutralizing antibodies and pathogenesis of hepatitis C virus infection. Viruses *4*, 2016–2030.

Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. Cell Death Differ. *9*, 1069–1077.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nat. Immunol. *4*, 1206–1212.

Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., et al. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 6752–6761.

Fallarino, F., Volpi, C., Zelante, T., Vacca, C., Calvitti, M., Fioretti, M.C., Puccetti, P., Romani, L., and Grohmann, U. (2009). IDO mediates TLR9-driven protection from experimental autoimmune diabetes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 6303–6312.

Fallarino, F., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. Eur. J. Immunol. *42*, 1932–1937.

Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J.C., Strazzera, A., Chien, D.Y., Munoz, S.J., Balestrieri, A., et al. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. Science *288*, 339–344.

Fauvelle, C., Lepiller, Q., Felmlee, D.J., Fofana, I., Habersetzer, F., Stoll-Keller, F., Baumert, T.F., and Fafi-Kremer, S. (2013). Hepatitis C virus vaccines--progress and perspectives. Microb. Pathog. *58*, 66–72.

Favre, D., Mold, J., Hunt, P.W., Kanwar, B., Loke, P., Seu, L., Barbour, J.D., Lowe, M.M., Jayawardene, A., Aweeka, F., et al. (2010a). Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. Sci. Transl. Med. *2*, 32ra36.

Favre, D., Mold, J., Hunt, P.W., Kanwar, B., Loke, P., Seu, L., Barbour, J.D., Lowe, M.M., Jayawardene, A., Aweeka, F., et al. (2010b). Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. Sci. Transl. Med. *2*, 32ra36.

Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., and Holland, P.V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. N. Engl. J. Med. *292*, 767–770.

Feinstone, S.M., Mihalik, K.B., Kamimura, T., Alter, H.J., London, W.T., and Purcell, R.H. (1983). Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. Infect. Immun. *41*, 816–821.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *136*, E359–E386.

Fitzmaurice, K., Petrovic, D., Ramamurthy, N., Simmons, R., Merani, S., Gaudieri, S., Sims, S., Dempsey, E., Freitas, E., Lea, S., et al. (2011). Molecular footprints reveal the impact of the protective HLA-A*03 allele in hepatitis C virus infection. Gut *60*, 1563–1571.

Flisiak, R., Feinman, S.V., Jablkowski, M., Horban, A., Kryczka, W., Pawlowska, M., Heathcote, J.E., Mazzella, G., Vandelli, C., Nicolas-Métral, V., et al. (2009). The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. Hepatol. Baltim. Md *49*, 1460–1468.

Le Floc'h, N., Otten, W., and Merlot, E. (2011). Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. Amino Acids *41*, 1195–1205.

Fofana, I., Jilg, N., Chung, R.T., and Baumert, T.F. (2014). Entry inhibitors and future treatment of hepatitis C. Antiviral Res. *104*, 136–142.

Forouhar, F., Anderson, J.L.R., Mowat, C.G., Vorobiev, S.M., Hussain, A., Abashidze, M., Bruckmann, C., Thackray, S.J., Seetharaman, J., Tucker, T., et al. (2007). Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 473–478.

Fox, J.M., Sage, L.K., Huang, L., Barber, J., Klonowski, K.D., Mellor, A.L., Tompkins, S.M., and Tripp, R.A. (2013). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances the T-cell response to influenza virus infection. J. Gen. Virol. *94*, 1451–1461.

Fox, J.M., Sage, L.K., Poore, S., Johnson, S., Tompkins, S.M., and Tripp, R.A. (2014). Drug analog inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity modifies pattern recognition receptor expression and proinflammatory cytokine responses early during influenza virus infection. J. Leukoc. Biol.

Frank, C., Mohamed, M.K., Strickland, G.T., Lavanchy, D., Arthur, R.R., Magder, L.S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E.S., Anwar, W., et al. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. Lancet *355*, 887–891.

Frey, S.E., Houghton, M., Coates, S., Abrignani, S., Chien, D., Rosa, D., Pileri, P., Ray, R., Di Bisceglie, A.M., Rinella, P., et al. (2010). Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. Vaccine *28*, 6367–6373.

Friberg, M., Jennings, R., Alsarraj, M., Dessureault, S., Cantor, A., Extermann, M., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Antonia, S.J. (2002). Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *101*, 151–155.

Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. J. Virol. *75*, 12047–12057.

Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.-P., and Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. J. Virol. *79*, 380–392.

Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. J. Exp. Med. *196*, 459–468.

Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H., and Seishima, M. (2006a). The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. J. Biochem. (Tokyo) *139*, 655–662.

Fujigaki, H., Saito, K., Lin, F., Fujigaki, S., Takahashi, K., Martin, B.M., Chen, C.Y., Masuda, J., Kowalak, J., Takikawa, O., et al. (2006b). Nitration and inactivation of IDO by peroxynitrite. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 372–379.

Fujigaki, H., Seishima, M., and Saito, K. (2012). Posttranslational modification of indoleamine 2,3-dioxygenase. Anal. Bioanal. Chem. *403*, 1777–1782.

Fujigaki, S., Saito, K., Sekikawa, K., Tone, S., Takikawa, O., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., and Seishima, M. (2001). Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism. Eur. J. Immunol. *31*, 2313–2318.

Ganong, A.H., and Cotman, C.W. (1986). Kynurenic acid and quinolinic acid act at N-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus. J. Pharmacol. Exp. Ther. *236*, 293–299.

Garrone, P., Fluckiger, A.-C., Mangeot, P.E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., Cangialosi, A., Du Chéné, I., LeGrand, R., Mangeot, I., et al. (2011). A prime-boost strategy using virus-like

particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. Sci. Transl. Med. *3*, 94ra71.

Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., et al. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature *461*, 399–401.

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

Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Zachoval, R., Gruener, N.H., Jung, M.-C., Ulsenheimer, A., Schraut, W.W., Schirren, C.A., Waechtler, M., Backmund, M., et al. (2003). Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. Gastroenterology *125*, 80–88.

Godin-Ethier, J., Hanafi, L.-A., Piccirillo, C.A., and Lapointe, R. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 6985–6991.

Gould, E.A., and Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. Lancet *371*, 500–509.

Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K., and Razavi, H. (2014). Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. J. Hepatol. *61*, S45–S57.

Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.-H., Hanson, H.L., Ghrayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., and Walker, C.M. (2003). HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. Science *302*, 659–662.

Grohmann, U., and Bronte, V. (2010). Control of immune response by amino acid metabolism. Immunol. Rev. *236*, 243–264.

Grohmann, U., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Silla, S., Fallarino, F., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2000). IFN-gamma inhibits presentation of a tumor/self peptide by CD8 alpha- dendritic cells via potentiation of the CD8 alpha+ subset. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *165*, 1357–1363.

Grohmann, U., Volpi, C., Fallarino, F., Bozza, S., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Ayroldi, E., Nocentini, G., et al. (2007). Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. Nat. Med. *13*, 579–586.

Grompe, M., Lindstedt, S., al-Dhalimy, M., Kennaway, N.G., Papaconstantinou, J., Torres-Ramos, C.A., Ou, C.N., and Finegold, M. (1995). Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nat. Genet. *10*, 453–460.

Guedj, J., Yu, J., Levi, M., Li, B., Kern, S., Naoumov, N.V., and Perelson, A.S. (2014). Modeling viral kinetics and treatment outcome during alisporivir interferon-free treatment in hepatitis C virus genotype 2 and 3 patients. Hepatol. Baltim. Md *59*, 1706–1714.

Guillonneau, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffoleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. J. Clin. Invest. *117*, 1096–1106.

Guirado, E., and Schlesinger, L.S. (2013). Modeling the Mycobacterium tuberculosis Granuloma – the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. Front. Immunol. *4*.

Gutti, T.L., Knibbe, J.S., Makarov, E., Zhang, J., Yannam, G.R., Gorantla, S., Sun, Y., Mercer, D.F., Suemizu, H., Wisecarver, J.L., et al. (2014). Human hepatocytes and hematolymphoid dual reconstitution in treosulfan-conditioned uPA-NOG mice. Am. J. Pathol. *184*, 101–109.

Von Hahn, T., Yoon, J.C., Alter, H., Rice, C.M., Rehermann, B., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. Gastroenterology *132*, 667–678.

Han, Y., Chen, Z., Yang, Y., Jiang, Z., Gu, Y., Liu, Y., Lin, C., Pan, Z., Yu, Y., Jiang, M., et al. (2014). Human CD14+ CTLA-4+ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. Hepatol. Baltim. Md *59*, 567–579.

Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G.L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., et al. (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. J. Biol. Chem. *285*, 21092–21102.

Hassanain, H.H., Chon, S.Y., and Gupta, S.L. (1993). Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. J. Biol. Chem. *268*, 5077–5084.

Hayashi, T., Rao, S.P., Takabayashi, K., Van Uden, J.H., Kornbluth, R.S., Baird, S.M., Taylor, M.W., Carson, D.A., Catanzaro, A., and Raz, E. (2001). Enhancement of innate immunity against Mycobacterium avium infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. Infect. Immun. *69*, 6156–6164.

He, L.F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1987). Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. J. Infect. Dis. *156*, 636–640.

Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. EMBO J. *27*, 3300–3310.

Heseler, K., Spekker, K., Schmidt, S.K., MacKenzie, C.R., and Däubener, W. (2008). Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation. FEMS Immunol. Med. Microbiol. *52*, 273–281.

Heydtmann, M. (2009). Macrophages in hepatitis B and hepatitis C virus infections. J. Virol. *83*, 2796–2802.

Higashitani, K., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Matsubara, T., Kakita, N., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., et al. (2013). Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. J. Gastroenterol. *48*, 660–670.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N. Engl. J. Med. *363*, 711–723.

Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., and Timms, P. (2004). Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. Infect. Immun. *72*, 1843–1855.

Hong, X., Yu, R.-B., Sun, N.-X., Wang, B., Xu, Y.-C., and Wu, G.-L. (2005). Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. World J. Gastroenterol. WJG *11*, 7302–7307.

Horner, S.M., and Gale, M. (2013). Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. Nat. Med. *19*, 879–888.

Hoshi, M., Saito, K., Hara, A., Taguchi, A., Ohtaki, H., Tanaka, R., Fujigaki, H., Osawa, Y., Takemura, M., Matsunami, H., et al. (2010). The absence of IDO upregulates type I IFN production, resulting in suppression of viral replication in the retrovirus-infected mouse. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 3305–3312.

Hou, D.-Y., Muller, A.J., Sharma, M.D., DuHadaway, J., Banerjee, T., Johnson, M., Mellor, A.L., Prendergast, G.C., and Munn, D.H. (2007). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. Cancer Res. *67*, 792–801.

Hryniewicz, A., Boasso, A., Edghill-Smith, Y., Vaccari, M., Fuchs, D., Venzon, D., Nacsa, J., Betts, M.R., Tsai, W.-P., Heraud, J.-M., et al. (2006). CTLA-4 blockade decreases TGF-beta, IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac251-infected macaques. Blood *108*, 3834–3842.

Huang, L., Li, L., Klonowski, K.D., Tompkins, S.M., Tripp, R.A., and Mellor, A.L. (2013). Induction and role of indoleamine 2,3 dioxygenase in mouse models of influenza a virus infection. PloS One *8*, e66546.

Huang, Y., Staschke, K., De Francesco, R., and Tan, S.-L. (2007). Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? Virology *364*, 1–9.

Huengsberg, M., Winer, J.B., Gompels, M., Round, R., Ross, J., and Shahmanesh, M. (1998). Serum kynurenine-to-tryptophan ratio increases with progressive disease in HIV-infected patients. Clin. Chem. *44*, 858–862.

Huttunen, R., Syrjänen, J., Aittoniemi, J., Oja, S.S., Raitala, A., Laine, J., Pertovaara, M., Vuento, R., Huhtala, H., and Hurme, M. (2010). High activity of indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. Shock Augusta Ga *33*, 149–154.

Iken, K., Liu, K., Liu, H., Bizargity, P., Wang, L., Hancock, W.W., and Visner, G.A. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase and metabolites protect murine lung allografts and impair the calcium mobilization of T cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *47*, 405–416.

Inaba, T., Ino, K., Kajiyama, H., Yamamoto, E., Shibata, K., Nawa, A., Nagasaka, T., Akimoto, H., Takikawa, O., and Kikkawa, F. (2009). Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. Gynecol. Oncol. *115*, 185–192.

Inaba, T., Ino, K., Kajiyama, H., Shibata, K., Yamamoto, E., Kondo, S., Umezu, T., Nawa, A., Takikawa, O., and Kikkawa, F. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. Gynecol. Oncol. *117*, 423–428.

Ino, K., Yoshida, N., Kajiyama, H., Shibata, K., Yamamoto, E., Kidokoro, K., Takahashi, N., Terauchi, M., Nawa, A., Nomura, S., et al. (2006). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. Br. J. Cancer *95*, 1555–1561.

Ino, K., Yamamoto, E., Shibata, K., Kajiyama, H., Yoshida, N., Terauchi, M., Nawa, A., Nagasaka, T., Takikawa, O., and Kikkawa, F. (2008). Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 2310–2317.

Ishio, T., Goto, S., Tahara, K., Tone, S., Kawano, K., and Kitano, S. (2004). Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. J. Gastroenterol. Hepatol. *19*, 319–326.

Ito, H., Ando, T., Ando, K., Ishikawa, T., Saito, K., Moriwaki, H., and Seishima, M. (2014). Induction of HBsAg-specific cytotoxic T lymphocytes can be up-regulated by the inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. Immunology.

Iwamoto, N., Ito, H., Ando, K., Ishikawa, T., Hara, A., Taguchi, A., Saito, K., Takemura, M., Imawari, M., Moriwaki, H., et al. (2009). Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocyte during acute hepatitis caused by hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver *29*, 277–283.

Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., et al. (2011). Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. N. Engl. J. Med. *364*, 2405–2416.

Jansen, M., and Reinhard, J.F. (1999). Interferon response heterogeneity: activation of a pro-inflammatory response by interferon alpha and beta. A possible basis for diverse responses to interferon beta in MS. J. Leukoc. Biol. *65*, 439–443.

Jenabian, M.-A., Patel, M., Kema, I., Kanagaratham, C., Radzioch, D., Thébault, P., Lapointe, R., Tremblay, C., Gilmore, N., Ancuta, P., et al. (2013). Distinct tryptophan catabolism and Th17/Treg balance in HIV progressors and elite controllers. PloS One *8*, e78146.

Jeong, Y.-I., Kim, S.W., Jung, I.D., Lee, J.S., Chang, J.H., Lee, C.-M., Chun, S.H., Yoon, M.-S., Kim, G.T., Ryu, S.W., et al. (2009). Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the Janus-activated kinase-protein kinase Cdelta-STAT1 signaling pathway in interferon-gamma-stimulated murine dendritic cells. J. Biol. Chem. *284*, 3700–3708.

Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Kanazawa, Y., Hiramatsu, N., and Hayashi, N. (2004). Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *173*, 6072–6081.

Jo, J., Aichele, U., Kersting, N., Klein, R., Aichele, P., Bisse, E., Sewell, A.K., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Lohmann, V., et al. (2009). Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. Gastroenterology *136*, 1391–1401.

Jo, J., Bengsch, B., Seigel, B., Rau, S.J., Schmidt, J., Bisse, E., Aichele, P., Aichele, U., Joeckel, L., Royer, C., et al. (2012). Low perforin expression of early differentiated HCV-specific CD8+ T cells limits their hepatotoxic potential. J. Hepatol. *57*, 9–16.

Jones, D.M., Patel, A.H., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2009). The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. J. Virol. *83*, 2163–2177.

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. Science *309*, 1577–1581.

Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu. Rev. Immunol. *30*, 531–564.

Jung, I.D., Lee, M.-G., Chang, J.H., Lee, J.S., Jeong, Y.-I., Lee, C.-M., Park, W.S., Han, J., Seo, S.-K., Lee, S.Y., et al. (2009). Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 3146–3154.

Kanazawa, N., Kurosaki, M., Sakamoto, N., Enomoto, N., Itsui, Y., Yamashiro, T., Tanabe, Y., Maekawa, S., Nakagawa, M., Chen, C.-H., et al. (2004). Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. J. Virol. *78*, 9713–9720.

Kaper, T., Looger, L.L., Takanaga, H., Platten, M., Steinman, L., and Frommer, W.B. (2007). Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle. PLoS Biol. *5*, e257.

Kaplan, D.E., Sugimoto, K., Newton, K., Valiga, M.E., Ikeda, F., Aytaman, A., Nunes, F.A., Lucey, M.R., Vance, B.A., Vonderheide, R.H., et al. (2007). Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. Gastroenterology *132*, 654–666.

Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J.A., Firth, C., Hirschberg, D.L., Rice, C.M., Shields, S., et al. (2011). Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 11608–11613.

Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., and Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. J. Med. Virol. *64*, 334–339.

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. Gastroenterology *125*, 1808–1817.

Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lopez, M.Z., Lohmann, V., Luban, J., et al. (2009). Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. PLoS Pathog. *5*, e1000546.

Kenny-Walsh, E. (1999). Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. N. Engl. J. Med. *340*, 1228–1233.

Kim, A.Y., Kuntzen, T., Timm, J., Nolan, B.E., Baca, M.A., Reyor, L.L., Berical, A.C., Feller, A.J., Johnson, K.L., Schulze zur Wiesch, J., et al. (2011). Spontaneous control of HCV is associated with expression of HLA-B 57 and preservation of targeted epitopes. Gastroenterology *140*, 686–696.e1.

Kim, W.R., Terrault, N.A., Pedersen, R.A., Therneau, T.M., Edwards, E., Hindman, A.A., and Brosgart, C.L. (2009). Trends in waiting list registration for liver transplantation for viral hepatitis in the United States. Gastroenterology *137*, 1680–1686.

Knubel, C.P., Martínez, F.F., Fretes, R.E., Díaz Lujan, C., Theumer, M.G., Cervi, L., and Motrán, C.C. (2010). Indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) is critical for host resistance against Trypanosoma cruzi. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *24*, 2689–2701.

Kohl, C., Walch, T., Huber, R., Kemmler, G., Neurauter, G., Fuchs, D., Sölder, E., Schröcksnadel, H., and Sperner-Unterweger, B. (2005). Measurement of tryptophan, kynurenine and neopterin in women with and without postpartum blues. J. Affect. Disord. *86*, 135–142.

Kolodziej, L.R., Paleolog, E.M., and Williams, R.O. (2011). Kynurenine metabolism in health and disease. Amino Acids *41*, 1173–1183.

Konan, K.V., and Taylor, M.W. (1996). Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. J. Biol. Chem. *271*, 19140–19145.

Krakauer, T., and Oppenheim, J.J. (1993). IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma-induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). J. Immunol. Baltim. Md 1950 *150*, 1205–1211.

Kudo, Y., and Boyd, C.A. (2001). The role of L-tryptophan transport in L-tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase in human placental explants. J. Physiol. *531*, 417–423.

Kudo, Y., Boyd, C. a. R., Spyropoulou, I., Redman, C.W.G., Takikawa, O., Katsuki, T., Hara, T., Ohama, K., and Sargent, I.L. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. J. Reprod. Immunol. *61*, 87–98.

Van de Laar, T., Pybus, O., Bruisten, S., Brown, D., Nelson, M., Bhagani, S., Vogel, M., Baumgarten, A., Chaix, M.-L., Fisher, M., et al. (2009). Evidence of a large, international network of HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men. Gastroenterology *136*, 1609–1617.

Laich, A., Neurauter, G., Widner, B., and Fuchs, D. (2002). More rapid method for simultaneous measurement of tryptophan and kynurenine by HPLC. Clin. Chem. *48*, 579–581.

Lambotin, M., Baumert, T.F., and Barth, H. (2010). Distinct intracellular trafficking of hepatitis C virus in myeloid and plasmacytoid dendritic cells. J. Virol. *84*, 8964–8969.

Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., and Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. Science *327*, 198–201.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. Cell *149*, 274–293.

Larrea, E., Riezu-Boj, J.I., Gil-Guerrero, L., Casares, N., Aldabe, R., Sarobe, P., Civeira, M.P., Heeney, J.L., Rollier, C., Verstrepen, B., et al. (2007). Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. J. Virol. *81*, 3662–3666.

Larsson, M., Shankar, E.M., Che, K.F., Saeidi, A., Ellegård, R., Barathan, M., Velu, V., and Kamarulzaman, A. (2013). Molecular signatures of T-cell inhibition in HIV-1 infection. Retrovirology *10*, 31.

Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A.W., Stamataki, Z., Gastaminza, P., Chisari, F.V., Jones, I.M., Fox, R.I., et al. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. Nat. Med. *14*, 25–27.

Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B.D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. J. Exp. Med. *191*, 1499–1512.

Lefèvre, M., Felmlee, D.J., Parnot, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2014). Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. PloS One *9*, e95550.

Li, Q., Li, L., Liu, Y., Fu, X., Qiao, D., Wang, H., Lao, S., Huang, F., and Wu, C. (2011). Pleural fluid from tuberculous pleurisy inhibits the functions of T cells and the differentiation of Th1 cells via immunosuppressive factors. Cell. Mol. Immunol. *8*, 172–180.

Li, Q., Pène, V., Krishnamurthy, S., Cha, H., and Liang, T.J. (2013). Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK-α in lipogenesis and viral assembly. Nat. Med. *19*, 722–729.

Li, T., Yang, Y., Hua, X., Wang, G., Liu, W., Jia, C., Tai, Y., Zhang, Q., and Chen, G. (2012). Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. Cancer Lett. *318*, 154–161.

Liang, T.J. (2013). Current progress in development of hepatitis C virus vaccines. Nat. Med. *19*, 869–878.

Liang, T.J., and Ghany, M.G. (2013). Current and future therapies for hepatitis C virus infection. N. Engl. J. Med. *368*, 1907–1917.

Liang, Y., Shilagard, T., Xiao, S.-Y., Snyder, N., Lau, D., Cicalese, L., Weiss, H., Vargas, G., and Lemon, S.M. (2009). Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. Gastroenterology *137*, 1448–1458.

Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. Nat. Rev. Microbiol. *11*, 688–700.

Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., et al. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science *309*, 623–626.

Liu, H., Liu, L., Fletcher, B.S., and Visner, G.A. (2006). Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *20*, 2384–2386.

Liu, M., Guo, S., Hibbert, J.M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N.O., and Stiles, J.K. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. Cytokine Growth Factor Rev. *22*, 121–130.

Liu, P., Xie, B.-L., Cai, S.-H., He, Y.-W., Zhang, G., Yi, Y.-M., and Du, J. (2009). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in nasopharyngeal carcinoma impairs the cytolytic function of peripheral blood lymphocytes. BMC Cancer *9*, 416.

Liu, X., Shin, N., Koblish, H.K., Yang, G., Wang, Q., Wang, K., Leffet, L., Hansbury, M.J., Thomas, B., Rupar, M., et al. (2010). Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. Blood *115*, 3520–3530.

Lo, B.K.K., Jalili, R.B., Zloty, D., Ghahary, A., Cowan, B., Dutz, J.P., Carr, N., Shapiro, J., and McElwee, K.J. (2011). CXCR3 ligands promote expression of functional indoleamine 2,3-dioxygenase in basal cell carcinoma keratinocytes. Br. J. Dermatol. *165*, 1030–1036.

Löb, S., Königsrainer, A., Zieker, D., Brücher, B.L.D.M., Rammensee, H.-G., Opelz, G., and Terness, P. (2009). IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. Cancer Immunol. Immunother. CII *58*, 153–157.

Lohmann, V. (2013). Hepatitis C virus RNA replication. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *369*, 167–198.

Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science *285*, 110–113.

Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2003). Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. J. Virol. *77*, 3007–3019.

Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. Immunity *34*, 680–692.

Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. Nat. Med. *17*, 589–595.

Lutchman, G., Danehower, S., Song, B.-C., Liang, T.J., Hoofnagle, J.H., Thomson, M., and Ghany, M.G. (2007). Mutation rate of the hepatitis C virus NS5B in patients undergoing treatment with ribavirin monotherapy. Gastroenterology *132*, 1757–1766.

Lyons, A.B. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. J. Immunol. Methods *243*, 147–154.

Machlin, E.S., Sarnow, P., and Sagan, S.M. (2011). Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 3193–3198.

Maes, M., Verkerk, R., Bonaccorso, S., Ombelet, W., Bosmans, E., and Scharpé, S. (2002). Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine, a phenomenon which is related to immune activation. Life Sci. *71*, 1837–1848.

Magiorkinis, G., Magiorkinis, E., Paraskevis, D., Ho, S.Y.W., Shapiro, B., Pybus, O.G., Allain, J.-P., and Hatzakis, A. (2009). The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. PLoS Med. *6*, e1000198.

Maheshwari, A., Ray, S., and Thuluvath, P.J. (2008). Acute hepatitis C. Lancet *372*, 321–332.

Makris, M., Preston, F.E., Triger, D.R., Underwood, J.C., Choo, Q.L., Kuo, G., and Houghton, M. (1990). Hepatitis C antibody and chronic liver disease in haemophilia. Lancet *335*, 1117–1119.

Manns, M.P., Wedemeyer, H., and Cornberg, M. (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. Gut *55*, 1350–1359.

Mansfield, A.S., Heikkila, P.S., Vaara, A.T., von Smitten, K.A.J., Vakkila, J.M., and Leidenius, M.H.K. (2009). Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. BMC Cancer *9*, 231.

Mao, R., Zhang, J., Jiang, D., Cai, D., Levy, J.M., Cuconati, A., Block, T.M., Guo, J.-T., and Guo, H. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells. J. Virol. *85*, 1048–1057.

Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genescà, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gómez, J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. J. Virol. *66*, 3225–3229.

Mast, E.E., Hwang, L.-Y., Seto, D.S.Y., Nolte, F.S., Nainan, O.V., Wurtzel, H., and Alter, M.J. (2005). Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. J. Infect. Dis. *192*, 1880–1889.

Mathers, B.M., Degenhardt, L., Phillips, B., Wiessing, L., Hickman, M., Strathdee, S.A., Wodak, A., Panda, S., Tyndall, M., Toufik, A., et al. (2008). Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review. Lancet *372*, 1733–1745.

Mayo, M.J. (2003). Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. Am. J. Med. Sci. *325*, 135–148.

Mboko, W.P., Mounce, B.C., Emmer, J., Darrah, E., Patel, S.B., and Tarakanova, V.L. (2014). Interferon regulatory factor 1 restricts gammaherpesvirus replication in primary immune cells. J. Virol. *88*, 6993–7004.

McGaha, T.L., Huang, L., Lemos, H., Metz, R., Mautino, M., Prendergast, G.C., and Mellor, A.L. (2012). Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity. Immunol. Rev. *249*, 135–157.

McKiernan, S.M., Hagan, R., Curry, M., McDonald, G.S.A., Kelly, A., Nolan, N., Walsh, A., Hegarty, J., Lawlor, E., and Kelleher, D. (2004). Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. Hepatol. Baltim. Md *40*, 108–114.

McLauchlan, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. J. Viral Hepat. *7*, 2–14.

Mehta, S.H., Brancati, F.L., Strathdee, S.A., Pankow, J.S., Netski, D., Coresh, J., Szklo, M., and Thomas, D.L. (2003). Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. Hepatol. Baltim. Md *38*, 50–56.

Meininger, D., Zalameda, L., Liu, Y., Stepan, L.P., Borges, L., McCarter, J.D., and Sutherland, C.L. (2011). Purification and kinetic characterization of human indoleamine 2,3-dioxygenases 1 and 2 (IDO1 and IDO2) and discovery of selective IDO1 inhibitors. Biochim. Biophys. Acta *1814*, 1947–1954.

Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat. Rev. Immunol. *4*, 762–774.

Mellor, A.L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P.A., Iwashima, M., and Munn, D.H. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 1652–1655.

Mellor, A.L., Chandler, P., Baban, B., Hansen, A.M., Marshall, B., Pihkala, J., Waldmann, H., Cobbold, S., Adams, E., and Munn, D.H. (2004). Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. Int. Immunol. *16*, 1391–1401.

Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., et al. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. Nat. Med. *7*, 927–933.

Merz, A., Long, G., Hiet, M.-S., Brügger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. J. Biol. Chem. *286*, 3018–3032.

Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., and Barnes, E. (2014). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatol. Baltim. Md.

Metz, P., Dazert, E., Ruggieri, A., Mazur, J., Kaderali, L., Kaul, A., Zeuge, U., Windisch, M.P., Trippler, M., Lohmann, V., et al. (2012a). Identification of type I and type II interferon-induced effectors controlling hepatitis C virus replication. Hepatol. Baltim. Md *56*, 2082–2093.

Metz, R., Duhadaway, J.B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A.J., and Prendergast, G.C. (2007). Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. Cancer Res. *67*, 7082–7087.

Metz, R., Rust, S., Duhadaway, J.B., Mautino, M.R., Munn, D.H., Vahanian, N.N., Link, C.J., and Prendergast, G.C. (2012b). IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. Oncoimmunology *1*, 1460–1468.

Metz, R., Smith, C., DuHadaway, J.B., Chandler, P., Baban, B., Merlo, L.M.F., Pigott, E., Keough, M.P., Rust, S., Mellor, A.L., et al. (2014). IDO2 is critical for IDO1-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation. Int. Immunol. *26*, 357–367.

Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Roskams, T., and Leroux-Roels, G. (2005). Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. Hepatol. Baltim. Md *41*, 847–856.

Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., and Bradfield, C.A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 3190–3198.

Miki, T., Sun, H., Lee, Y., Tandin, A., Kovscek, A.M., Subbotin, V., Fung, J.J., and Valdivia, L.A. (2001). Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. Transplant. Proc. *33*, 129–130.

Miller, S., and Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. Nat. Rev. Microbiol. *6*, 363–374.

Miyoshi, H., Fujie, H., Shintani, Y., Tsutsumi, T., Shinzawa, S., Makuuchi, M., Kokudo, N., Matsuura, Y., Suzuki, T., Miyamura, T., et al. (2005). Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. J. Hepatol. *43*, 757–763.

Moffett, J.R., and Namboodiri, M.A. (2003). Tryptophan and the immune response. Immunol. Cell Biol. *81*, 247–265.

Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A.D., and Wiersma, S.T. (2013). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatol. Baltim. Md *57*, 1333–1342.

Moheno, P., Morrey, J., and Fuchs, D. (2010). Effect of dipterinyl calcium pentahydrate on hepatitis B virus replication in transgenic mice. J. Transl. Med. *8*, 32.

Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. Nat. Rev. Microbiol. *5*, 453–463.

Mosley, J.W., Operskalski, E.A., Tobler, L.H., Andrews, W.W., Phelps, B., Dockter, J., Giachetti, C., and Busch, M.P. (2005). Viral and host factors in early hepatitis C virus infection. Hepatol. Baltim. Md *42*, 86–92.

Müller, A., Heseler, K., Schmidt, S.K., Spekker, K., Mackenzie, C.R., and Däubener, W. (2009). The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. J. Cell. Mol. Med. *13*, 1125–1135.

Muller, A.J., DuHadaway, J.B., Donover, P.S., Sutanto-Ward, E., and Prendergast, G.C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. Nat. Med. *11*, 312–319.

Muller, A.J., Sharma, M.D., Chandler, P.R., Duhadaway, J.B., Everhart, M.E., Johnson, B.A., Kahler, D.J., Pihkala, J., Soler, A.P., Munn, D.H., et al. (2008). Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 17073–17078.

Mulley, W.R., and Nikolic-Paterson, D.J. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation. Nephrol. Carlton Vic *13*, 204–211.

Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. Trends Immunol. *34*, 137–143.

Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A.L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science *281*, 1191–1193.

Munn, D.H., Sharma, M.D., and Mellor, A.L. (2004a). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 4100–4110.

Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A., and Mellor, A.L. (2004b). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. J. Clin. Invest. *114*, 280–290.

Munn, D.H., Sharma, M.D., Baban, B., Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., and Mellor, A.L. (2005). GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. Immunity *22*, 633–642.

Murata, K., Lechmann, M., Qiao, M., Gunji, T., Alter, H.J., and Liang, T.J. (2003). Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 6753–6758.

Murray, M.F. (2003). Nicotinamide: an oral antimicrobial agent with activity against both Mycobacterium tuberculosis and human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *36*, 453–460.

Murray, C.L., and Rice, C.M. (2011). Turning hepatitis C into a real virus. Annu. Rev. Microbiol. *65*, 307–327.

Murray, M.F., Langan, M., and MacGregor, R.R. (2001). Increased plasma tryptophan in HIV-infected patients treated with pharmacologic doses of nicotinamide. Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif *17*, 654–656.

Musso, T., Gusella, G.L., Brooks, A., Longo, D.L., and Varesio, L. (1994). Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. Blood *83*, 1408–1411.

Nattermann, J., Zimmermann, H., Iwan, A., von Lilienfeld-Toal, M., Leifeld, L., Nischalke, H.D., Langhans, B., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (2006). Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. Hepatol. Baltim. Md *44*, 945–954.

Ndongo, N., Berthillon, P., Pradat, P., Vieux, C., Bordes, I., Berby, F., Maynard, M., Zoulim, F., Trépo, C., and Petit, M.-A. (2010). Association of anti-E1E2 antibodies with spontaneous recovery or sustained viral response to therapy in patients infected with hepatitis C virus. Hepatol. Baltim. Md *52*, 1531–1542.

Negro, F. (2010). Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. Gut *59*, 1279–1287.

Nelson, P.K., Mathers, B.M., Cowie, B., Hagan, H., Des Jarlais, D., Horyniak, D., and Degenhardt, L. (2011). Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. Lancet *378*, 571–583.

Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J., and Perelson, A.S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. Science *282*, 103–107.

Neumann-Haefelin, C., and Thimme, R. (2013). Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *369*, 243–262.

Nguyen, H., Hiscott, J., and Pitha, P.M. (1997). The growing family of interferon regulatory factors. Cytokine Growth Factor Rev. *8*, 293–312.

Nguyen, N.T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., and Kishimoto, T. (2010). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 19961–19966.

Nienhaus, A., Kesavachandran, C., Wendeler, D., Haamann, F., and Dulon, M. (2012). Infectious diseases in healthcare workers - an analysis of the standardised data set of a German compensation board. J. Occup. Med. Toxicol. Lond. Engl. *7*, 8.

Niño-Castro, A., Abdullah, Z., Popov, A., Thabet, Y., Beyer, M., Knolle, P., Domann, E., Chakraborty, T., Schmidt, S.V., and Schultze, J.L. (2014). The IDO1-induced kynurenines play a major role in the antimicrobial effect of human myeloid cells against Listeria monocytogenes. Innate Immun. *20*, 401–411.

Niwa, Y., Kanda, H., Shikauchi, Y., Saiura, A., Matsubara, K., Kitagawa, T., Yamamoto, J., Kubo, T., and Yoshikawa, H. (2005). Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. Oncogene *24*, 6406–6417.

Njau, F., Geffers, R., Thalmann, J., Haller, H., and Wagner, A.D. (2009). Restriction of Chlamydia pneumoniae replication in human dendritic cell by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. Microbes Infect. Inst. Pasteur *11*, 1002–1010.

O'Connor, J.C., André, C., Wang, Y., Lawson, M.A., Szegedi, S.S., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (2009a). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 4200–4209.

O'Connor, J.C., Lawson, M.A., André, C., Briley, E.M., Szegedi, S.S., Lestage, J., Castanon, N., Herkenham, M., Dantzer, R., and Kelley, K.W. (2009b). Induction of IDO by bacille Calmette-Guérin is responsible for development of murine depressive-like behavior. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 3202–3212.

O'Connor, J.C., Lawson, M.A., André, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (2009c). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. Mol. Psychiatry *14*, 511–522.

Ohmori, Y., Schreiber, R.D., and Hamilton, T.A. (1997). Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. J. Biol. Chem. *272*, 14899–14907.

Onodera, T., Jang, M.H., Guo, Z., Yamasaki, M., Hirata, T., Bai, Z., Tsuji, N.M., Nagakubo, D., Yoshie, O., Sakaguchi, S., et al. (2009). Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 5608–5614.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., et al. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature *478*, 197–203.

Orabona, C., Pallotta, M.T., Volpi, C., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2008). SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 20828–20833.

Osburn, W.O., Fisher, B.E., Dowd, K.A., Urban, G., Liu, L., Ray, S.C., Thomas, D.L., and Cox, A.L. (2010). Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. Gastroenterology *138*, 315–324.

Outinen, T.K., Mäkelä, S.M., Ala-Houhala, I.O., Huhtala, H.S.A., Hurme, M., Libraty, D.H., Oja, S.S., Pörsti, I.H., Syrjänen, J.T., Vaheri, A., et al. (2011). High activity of indoleamine 2,3-dioxygenase is associated with renal insufficiency in Puumala hantavirus induced nephropathia epidemica. J. Med. Virol. *83*, 731–737.

Owusu Sekyere, S., Suneetha, P.V., Kraft, A.R.M., Zhang, S., Dietz, J., Sarrazin, C., Manns, M.P., Schlaphoff, V., Cornberg, M., and Wedemeyer, H. (2014). A heterogeneous hierarchy of co-regulatory receptors regulates exhaustion of HCV-specific CD8 T cells in patients with chronic hepatitis C. J. Hepatol.

Oxenkrug, G.F. (2010). Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1199*, 1–14.

Oxenkrug, G.F., Turski, W.A., Zgrajka, W., Weinstock, J.V., and Summergrad, P. (2013). Tryptophan-kynurenine metabolism and insulin resistance in hepatitis C patients. Hepat. Res. Treat. *2013*, 149247.

Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. Nat. Immunol. *12*, 870–878.

Pamer, E.G. (2004). Immune responses to Listeria monocytogenes. Nat. Rev. Immunol. *4*, 812–823.

Pan, K., Wang, H., Chen, M., Zhang, H., Weng, D., Zhou, J., Huang, W., Li, J., Song, H., and Xia, J. (2008). Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *134*, 1247–1253.

Pan, T.L., Lin, C.L., Chen, C.L., Lin, Y.C., Gojo, S., Lee, T.H., Wang, Y.H., Lord, R., Lai, C.Y., Tsu, L.W., et al. (2000). Identification of the indoleamine 2,3-dioxygenase nucleotide sequence in a rat liver transplant model. Transpl. Immunol. *8*, 189–194.

Pantouris, G., Serys, M., Yuasa, H.J., Ball, H.J., and Mowat, C.G. (2014). Human indoleamine 2,3-dioxygenase-2 has substrate specificity and inhibition characteristics distinct from those of indoleamine 2,3-dioxygenase-1. Amino Acids *46*, 2155–2163.

Patel, M.R., Loo, Y.-M., Horner, S.M., Gale, M., and Malik, H.S. (2012). Convergent evolution of escape from hepaciviral antagonism in primates. PLoS Biol. *10*, e1001282.

Pawlotsky, J.-M. (2014). New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. Gastroenterology *146*, 1176–1192.

Peng, B., Yu, M., Xu, S., Lee, Y.-J., Tian, Y., Yang, H., Chan, K., Mo, H., McHutchison, J., Delaney, W., et al. (2013). Development of robust hepatitis C virus genotype 4 subgenomic replicons. Gastroenterology *144*, 59–61.e6.

Penna, A., Pilli, M., Zerbini, A., Orlandini, A., Mezzadri, S., Sacchelli, L., Missale, G., and Ferrari, C. (2007). Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. Hepatol. Baltim. Md *45*, 588–601.

Perz, J.F., Armstrong, G.L., Farrington, L.A., Hutin, Y.J.F., and Bell, B.P. (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. J. Hepatol. *45*, 529–538.

Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., et al. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 6025–6030.

Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *81*, 908–912.

Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Wang, C., Ware, F., Sodora, D.L., and Gale, M. (2002). Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 4650–4655.

Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., and Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. J. Virol. *76*, 4008–4021.

Pietschmann, T., Zayas, M., Meuleman, P., Long, G., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Leroux-Roels, G., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2009). Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. PLoS Pathog. *5*, e1000475.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. Science *282*, 938–941.

Pine, R. (1997). Convergence of TNFalpha and IFNgamma signalling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/kappaB promoter element. Nucleic Acids Res. *25*, 4346–4354.

Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., and Rice, C.M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. Nature *457*, 882–886.

Poordad, F., McCone, J., Bacon, B.R., Bruno, S., Manns, M.P., Sulkowski, M.S., Jacobson, I.M., Reddy, K.R., Goodman, Z.D., Boparai, N., et al. (2011). Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. N. Engl. J. Med. *364*, 1195–1206.

Popov, A., Abdullah, Z., Wickenhauser, C., Saric, T., Driesen, J., Hanisch, F.-G., Domann, E., Raven, E.L., Dehus, O., Hermann, C., et al. (2006). Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following Listeria monocytogenes infection. J. Clin. Invest. *116*, 3160–3170.

Popov, A., Driesen, J., Abdullah, Z., Wickenhauser, C., Beyer, M., Debey-Pascher, S., Saric, T., Kummer, S., Takikawa, O., Domann, E., et al. (2008). Infection of myeloid dendritic cells with Listeria monocytogenes leads to the suppression of T cell function by multiple inhibitory mechanisms. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 4976–4988.

Potula, R., Poluektova, L., Knipe, B., Chrastil, J., Heilman, D., Dou, H., Takikawa, O., Munn, D.H., Gendelman, H.E., and Persidsky, Y. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in an animal model of HIV-1 encephalitis. Blood *106*, 2382–2390.

Powdrill, M.H., Tchesnokov, E.P., Kozak, R.A., Russell, R.S., Martin, R., Svarovskaia, E.S., Mo, H., Kouyos, R.D., and Götte, M. (2011). Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 20509–20513.

Powell, J.D., Pollizzi, K.N., Heikamp, E.B., and Horton, M.R. (2012). Regulation of immune responses by mTOR. Annu. Rev. Immunol. *30*, 39–68.

Puccetti, P., and Grohmann, U. (2007). IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. Nat. Rev. Immunol. *7*, 817–823.

Pybus, O.G., Charleston, M.A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E.C., and Harvey, P.H. (2001). The epidemic behavior of the hepatitis C virus. Science *292*, 2323–2325.

Raghuraman, S., Park, H., Osburn, W.O., Winkelstein, E., Edlin, B.R., and Rehermann, B. (2012). Spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of T-cell exhaustion. J. Infect. Dis. *205*, 763–771.

Rahman, S., Gudetta, B., Fink, J., Granath, A., Ashenafi, S., Aseffa, A., Derbew, M., Svensson, M., Andersson, J., and Brighenti, S.G. (2009). Compartmentalization of immune responses in human tuberculosis: few CD8+ effector T cells but elevated levels of FoxP3+ regulatory t cells in the granulomatous lesions. Am. J. Pathol. *174*, 2211–2224.

Raina, M., and Ibba, M. (2014). tRNAs as regulators of biological processes. Front. Genet. *5*, 171.

Ramsauer, K., Farlik, M., Zupkovitz, G., Seiser, C., Kröger, A., Hauser, H., and Decker, T. (2007). Distinct modes of action applied by transcription factors STAT1 and IRF1 to initiate transcription of the IFN-gamma-inducible gbp2 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 2849–2854.

Ravishankar, B., Liu, H., Shinde, R., Chandler, P., Baban, B., Tanaka, M., Munn, D.H., Mellor, A.L., Karlsson, M.C.I., and McGaha, T.L. (2012). Tolerance to apoptotic cells is regulated by indoleamine 2,3-dioxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 3909–3914.

Raziorrouh, B., Ulsenheimer, A., Schraut, W., Heeg, M., Kurktschiev, P., Zachoval, R., Jung, M.-C., Thimme, R., Neumann-Haefelin, C., Horster, S., et al. (2011). Inhibitory molecules that regulate expansion and restoration of HCV-specific CD4+ T cells in patients with chronic infection. Gastroenterology *141*, 1422–1431, 1431.e1–e6.

Reeds, P.J., Fjeld, C.R., and Jahoor, F. (1994). Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states? J. Nutr. *124*, 906–910.

Rehermann, B. (2009). Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. J. Clin. Invest. *119*, 1745–1754.

Rehermann, B. (2013). Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. Nat. Med. *19*, 859–868.

Rehermann, B., Chang, K.M., McHutchison, J.G., Kokka, R., Houghton, M., and Chisari, F.V. (1996). Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. J. Clin. Invest. *98*, 1432–1440.

Ribeiro, R.M., Li, H., Wang, S., Stoddard, M.B., Learn, G.H., Korber, B.T., Bhattacharya, T., Guedj, J., Parrish, E.H., Hahn, B.H., et al. (2012). Quantifying the diversification of hepatitis C virus (HCV) during primary infection: estimates of the in vivo mutation rate. PLoS Pathog. *8*, e1002881.

Robinson, C.M., Shirey, K.A., and Carlin, J.M. (2003). Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res. *23*, 413–421.

Robinson, C.M., Hale, P.T., and Carlin, J.M. (2006). NF-kappa B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytokine *35*, 53–61.

Rollier, C.S., Paranhos-Baccala, G., Verschoor, E.J., Verstrepen, B.E., Drexhage, J.A.R., Fagrouch, Z., Berland, J.-L., Komurian-Pradel, F., Duverger, B., Himoudi, N., et al. (2007a). Vaccine-induced early

control of hepatitis C virus infection in chimpanzees fails to impact on hepatic PD-1 and chronicity. Hepatol. Baltim. Md *45*, 602–613.

Rollier, C.S., Paranhos-Baccala, G., Verschoor, E.J., Verstrepen, B.E., Drexhage, J.A.R., Fagrouch, Z., Berland, J.-L., Komurian-Pradel, F., Duverger, B., Himoudi, N., et al. (2007b). Vaccine-induced early control of hepatitis C virus infection in chimpanzees fails to impact on hepatic PD-1 and chronicity. Hepatol. Baltim. Md *45*, 602–613.

Romero-Gómez, M. (2006). Insulin resistance and hepatitis C. World J. Gastroenterol. WJG *12*, 7075–7080.

Rushbrook, S.M., Ward, S.M., Unitt, E., Vowler, S.L., Lucas, M., Klenerman, P., and Alexander, G.J.M. (2005). Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. J. Virol. *79*, 7852–7859.

Sainz, B., Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K.A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W.A., et al. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. Nat. Med. *18*, 281–285.

Sangiovanni, A., Prati, G.M., Fasani, P., Ronchi, G., Romeo, R., Manini, M., Del Ninno, E., Morabito, A., and Colombo, M. (2006). The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. Hepatol. Baltim. Md *43*, 1303–1310.

Sauné, K., Kamar, N., Miédougé, M., Weclawiak, H., Dubois, M., Izopet, J., and Rostaing, L. (2011). Decreased prevalence and incidence of HCV markers in haemodialysis units: a multicentric French survey. Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. *26*, 2309–2316.

Saxena, V., Ondr, J.K., Magnusen, A.F., Munn, D.H., and Katz, J.D. (2007). The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 5041–5053.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. EMBO J. *21*, 5017–5025.

Scheel, T.K.H., and Rice, C.M. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. Nat. Med. *19*, 837–849.

Schmidt, S.V., and Schultze, J.L. (2014). New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. Front. Immunol. *5*, 384.

Schmidt, S.K., Müller, A., Heseler, K., Woite, C., Spekker, K., MacKenzie, C.R., and Däubener, W. (2009). Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. Eur. J. Immunol. *39*, 2755–2764.

Schmitz, J.L., Carlin, J.M., Borden, E.C., and Byrne, G.I. (1989). Beta interferon inhibits Toxoplasma gondii growth in human monocyte-derived macrophages. Infect. Immun. *57*, 3254–3256.

Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. Annu. Rev. Immunol. *32*, 513–545.

Schnell, G., Loo, Y.-M., Marcotrigiano, J., and Gale, M. (2012). Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I. PLoS Pathog. *8*, e1002839.

Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. Nature *472*, 481–485.

Schröcksnadel, K., Widner, B., Bergant, A., Neurauter, G., Schennach, H., Schröcksnadel, H., and Fuchs, D. (2003). Longitudinal study of tryptophan degradation during and after pregnancy. Life Sci. *72*, 785–793.

Schulze Zur Wiesch, J., Ciuffreda, D., Lewis-Ximenez, L., Kasprowicz, V., Nolan, B.E., Streeck, H., Aneja, J., Reyor, L.L., Allen, T.M., Lohse, A.W., et al. (2012). Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. J. Exp. Med. *209*, 61–75.

Schwarcz, R., Whetsell, W.O., and Mangano, R.M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. Science *219*, 316–318.

Schweizer, M., and Peterhans, E. (2014). Pestiviruses. Annu. Rev. Anim. Biosci. *2*, 141–163.

Scott, G.N., DuHadaway, J., Pigott, E., Ridge, N., Prendergast, G.C., Muller, A.J., and Mandik-Nayak, L. (2009). The immunoregulatory enzyme IDO paradoxically drives B cell-mediated autoimmunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 7509–7517.

Sedlmayr, P., Blaschitz, A., and Stocker, R. (2014). The role of placental tryptophan catabolism. Front. Immunol. *5*, 230.

Seifert, U., Liermann, H., Racanelli, V., Halenius, A., Wiese, M., Wedemeyer, H., Ruppert, T., Rispeter, K., Henklein, P., Sijts, A., et al. (2004). Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. J. Clin. Invest. *114*, 250–259.

Serebrov, V., and Pyle, A.M. (2004). Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. Nature *430*, 476–480.

Seymour, R.L., Ganapathy, V., Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2006). A high-affinity, tryptophan-selective amino acid transport system in human macrophages. J. Leukoc. Biol. *80*, 1320–1327.

Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.-Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. J. Clin. Invest. *117*, 2570–2582.

Sharma, M.D., Hou, D.-Y., Liu, Y., Koni, P.A., Metz, R., Chandler, P., Mellor, A.L., He, Y., and Munn, D.H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. Blood *113*, 6102–6111.

Sheikh, M.Y., Choi, J., Qadri, I., Friedman, J.E., and Sanyal, A.J. (2008). Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. Hepatol. Baltim. Md *47*, 2127–2133.

Shi, Q., Jiang, J., and Luo, G. (2013). Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. J. Virol. *87*, 6866–6875.

Shimoike, T., McKenna, S.A., Lindhout, D.A., and Puglisi, J.D. (2009). Translational insensitivity to potent activation of PKR by HCV IRES RNA. Antiviral Res. *83*, 228–237.

Shirey, K.A., Jung, J.-Y., Maeder, G.S., and Carlin, J.M. (2006a). Upregulation of IFN-gamma receptor expression by proinflammatory cytokines influences IDO activation in epithelial cells. J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res. *26*, 53–62.

Shirey, K.A., Jung, J.-Y., Maeder, G.S., and Carlin, J.M. (2006b). Upregulation of IFN-gamma receptor expression by proinflammatory cytokines influences IDO activation in epithelial cells. J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res. *26*, 53–62.

Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghrayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003). Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. J. Exp. Med. *197*, 1645–1655.

Shuai, K., and Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. Nat. Rev. Immunol. *3*, 900–911.

Silva, N.M., Rodrigues, C.V., Santoro, M.M., Reis, L.F.L., Alvarez-Leite, J.I., and Gazzinelli, R.T. (2002). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with Toxoplasma gondii: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. Infect. Immun. *70*, 859–868.

Simister, P., Schmitt, M., Geitmann, M., Wicht, O., Danielson, U.H., Klein, R., Bressanelli, S., and Lohmann, V. (2009). Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. J. Virol. *83*, 11926–11939.

Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. J. Gen. Virol. *85*, 3173–3188.

Simmonds, P. (2013). The origin of hepatitis C virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *369*, 1–15.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., et al. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatol. Baltim. Md *42*, 962–973.

Van der Sluijs, K.F., Nijhuis, M., Levels, J.H.M., Florquin, S., Mellor, A.L., Jansen, H.M., van der Poll, T., and Lutter, R. (2006). Influenza-induced expression of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances interleukin-10 production and bacterial outgrowth during secondary pneumococcal pneumonia. J. Infect. Dis. *193*, 214–222.

Smith, A.K., Simon, J.S., Gustafson, E.L., Noviello, S., Cubells, J.F., Epstein, M.P., Devlin, D.J., Qiu, P., Albrecht, J.K., Brass, C.A., et al. (2012). Association of a polymorphism in the indoleamine- 2,3-dioxygenase gene and interferon-α-induced depression in patients with chronic hepatitis C. Mol. Psychiatry *17*, 781–789.

Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., and Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. Hepatol. Baltim. Md *59*, 318–327.

Sohn, S.-Y., and Hearing, P. (2011). Adenovirus sequesters phosphorylated STAT1 at viral replication centers and inhibits STAT dephosphorylation. J. Virol. *85*, 7555–7562.

Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., and Dawson, J.H. (1996). Heme-Containing Oxygenases. Chem. Rev. *96*, 2841–2888.

Sørensen, R.B., Køllgaard, T., Andersen, R.S., van den Berg, J.H., Svane, I.M., Straten, P. thor, and Andersen, M.H. (2011). Spontaneous cytotoxic T-Cell reactivity against indoleamine 2,3-dioxygenase-2. Cancer Res. *71*, 2038–2044.

Stapleton, J.T., Foung, S., Muerhoff, A.S., Bukh, J., and Simmonds, P. (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. J. Gen. Virol. *92*, 233–246.

Steinman, R.M. (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. Annu. Rev. Immunol. *30*, 1–22.

Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2013). Cell culture systems for hepatitis C virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *369*, 17–48.

Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., and Duarte, J.H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. Annu. Rev. Immunol. *32*, 403–432.

Sucher, R., Fischler, K., Oberhuber, R., Kronberger, I., Margreiter, C., Ollinger, R., Schneeberger, S., Fuchs, D., Werner, E.R., Watschinger, K., et al. (2012). IDO and regulatory T cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 Ig-mediated long-term solid organ allograft survival. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *188*, 37–46.

Sugimoto, H., Oda, S., Otsuki, T., Hino, T., Yoshida, T., and Shiro, Y. (2006). Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O2 incorporation by a heme-containing dioxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 2611–2616.

Sugimoto, K., Ikeda, F., Stadanlick, J., Nunes, F.A., Alter, H.J., and Chang, K.-M. (2003). Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. Hepatol. Baltim. Md *38*, 1437–1448.

Suh, H.-S., Zhao, M.-L., Rivieccio, M., Choi, S., Connolly, E., Zhao, Y., Takikawa, O., Brosnan, C.F., and Lee, S.C. (2007). Astrocyte indoleamine 2,3-dioxygenase is induced by the TLR3 ligand poly(I:C): mechanism of induction and role in antiviral response. J. Virol. *81*, 9838–9850.

Sulkowski, M.S., Gardiner, D.F., Rodriguez-Torres, M., Reddy, K.R., Hassanein, T., Jacobson, I., Lawitz, E., Lok, A.S., Hinestrosa, F., Thuluvath, P.J., et al. (2014). Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. N. Engl. J. Med. *370*, 211–221.

Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. J. Virol. *79*, 2689–2699.

Sundrud, M.S., Koralov, S.B., Feuerer, M., Calado, D.P., Kozhaya, A.E., Rhule-Smith, A., Lefebvre, R.E., Unutmaz, D., Mazitschek, R., Waldner, H., et al. (2009). Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. Science *324*, 1334–1338.

Suzuki, Y., Suda, T., Yokomura, K., Suzuki, M., Fujie, M., Furuhashi, K., Hahimoto, D., Enomto, N., Fujisawa, T., Nakamura, Y., et al. (2011). Serum activity of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts prognosis of community-acquired pneumonia. J. Infect. *63*, 215–222.

Suzuki, Y., Suda, T., Asada, K., Miwa, S., Suzuki, M., Fujie, M., Furuhashi, K., Nakamura, Y., Inui, N., Shirai, T., et al. (2012). Serum indoleamine 2,3-dioxygenase activity predicts prognosis of pulmonary tuberculosis. Clin. Vaccine Immunol. CVI *19*, 436–442.

Tabor, E., Gerety, R.J., Drucker, J.A., Seeff, L.B., Hoofnagle, J.H., Jackson, D.R., April, M., Barker, L.F., and Pineda-Tamondong, G. (1978). Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. Lancet *1*, 463–466.

Tagny, C.T., Mbanya, D., Tapko, J.-B., and Lefrère, J.-J. (2008). Blood safety in Sub-Saharan Africa: a multi-factorial problem. Transfusion (Paris) *48*, 1256–1261.

Taher, Y.A., Piavaux, B.J.A., Gras, R., van Esch, B.C.A.M., Hofman, G.A., Bloksma, N., Henricks, P.A.J., and van Oosterhout, A.J.M. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model. J. Allergy Clin. Immunol. *121*, 983–991.e2.

Takahashi, N., Duprez, L., Grootjans, S., Cauwels, A., Nerinckx, W., DuHadaway, J.B., Goossens, V., Roelandt, R., Van Hauwermeiren, F., Libert, C., et al. (2012). Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. Cell Death Dis. *3*, e437.

Takikawa, O. (2005). Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. *338*, 12–19.

Takikawa, O., Yoshida, R., Kido, R., and Hayaishi, O. (1986). Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. J. Biol. Chem. *261*, 3648–3653.

Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F., and Kido, R. (1988). Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. J. Biol. Chem. *263*, 2041–2048.

Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. *10*, 512–526.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. *30*, 2725–2729.

Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., and Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. Annu. Rev. Immunol. *26*, 535–584.

Tanaka, T., Kato, N., Cho, M.J., Sugiyama, K., and Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. J. Virol. *70*, 3307–3312.

Tattevin, P., Monnier, D., Tribut, O., Dulong, J., Bescher, N., Mourcin, F., Uhel, F., Le Tulzo, Y., and Tarte, K. (2010). Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. J. Infect. Dis. *201*, 956–966.

Taylor, M.W., and Feng, G.S. (1991). Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *5*, 2516–2522.

Teft, W.A., Kirchhof, M.G., and Madrenas, J. (2006). A molecular perspective of CTLA-4 function. Annu. Rev. Immunol. *24*, 65–97.

Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. PLoS Pathog. *4*, e1000032.

Terajima, M., and Leporati, A.M. (2005). Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antiviral Activity of Interferon-gamma Against Vaccinia Virus. Viral Immunol. *18*, 722–729.

Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. J. Exp. Med. *196*, 447–457.

Terrault, N.A., Dodge, J.L., Murphy, E.L., Tavis, J.E., Kiss, A., Levin, T.R., Gish, R.G., Busch, M.P., Reingold, A.L., and Alter, M.J. (2013). Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. Hepatol. Baltim. Md *57*, 881–889.

Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 15661–15668.

Thimme, R., Binder, M., and Bartenschlager, R. (2012). Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. FEMS Microbiol. Rev. *36*, 663–683.

Thomas, D.L., Villano, S.A., Riester, K.A., Hershow, R., Mofenson, L.M., Landesman, S.H., Hollinger, F.B., Davenny, K., Riley, L., Diaz, C., et al. (1998). Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. J. Infect. Dis. *177*, 1480–1488.

Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., et al. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature *461*, 798–801.

Thomas, S.R., Terentis, A.C., Cai, H., Takikawa, O., Levina, A., Lay, P.A., Freewan, M., and Stocker, R. (2007). Post-translational regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide. J. Biol. Chem. *282*, 23778–23787.

Thursz, M., and Fontanet, A. (2014). HCV transmission in industrialized countries and resource-constrained areas. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. *11*, 28–35.

Timm, J., Lauer, G.M., Kavanagh, D.G., Sheridan, I., Kim, A.Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L.L., Schulze zur Wiesch, J., et al. (2004). CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. J. Exp. Med. *200*, 1593–1604.

Tohme, R.A., and Holmberg, S.D. (2010). Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? Hepatol. Baltim. Md *52*, 1497–1505.

Tone, S., Takikawa, O., Habara-Ohkubo, A., Kadoya, A., Yoshida, R., and Kido, R. (1990). Primary structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase deduced from the nucleotide sequence of its cDNA. Nucleic Acids Res. *18*, 367.

Trilling, M., Le, V.T.K., Rashidi-Alavijeh, J., Katschinski, B., Scheller, J., Rose-John, S., Androsiac, G.E., Jonjic, S., Poli, V., Pfeffer, K., et al. (2014). "Activated" STAT proteins: a paradoxical consequence of inhibited JAK-STAT signaling in cytomegalovirus-infected cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *192*, 447–458.

Tsai, W.-L., and Chung, R.T. (2010). Viral hepatocarcinogenesis. Oncogene *29*, 2309–2324.

Ueno, A., Cho, S., Cheng, L., Wang, J., Hou, S., Nakano, H., Santamaria, P., and Yang, Y. (2007). Transient upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes. Diabetes *56*, 1686–1693.

Urbani, S., Amadei, B., Fisicaro, P., Tola, D., Orlandini, A., Sacchelli, L., Mori, C., Missale, G., and Ferrari, C. (2006). Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. Hepatol. Baltim. Md *44*, 126–139.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. Nat. Med. *9*, 1269–1274.

Vacca, P., Cantoni, C., Vitale, M., Prato, C., Canegallo, F., Fenoglio, D., Ragni, N., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2010). Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 11918–11923.

Vaccari, M., Boasso, A., Fenizia, C., Fuchs, D., Hryniewicz, A., Morgan, T., Weiss, D., Doster, M.N., Heraud, J.M., Shearer, G.M., et al. (2012). Fatal pancreatitis in simian immunodeficiency virus SIV(mac251)-infected macaques treated with 2',3'-dideoxyinosine and stavudine following cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen 4 and indoleamine 2,3-dioxygenase blockade. J. Virol. *86*, 108–113.

Vandenabeele, P., Grootjans, S., Callewaert, N., and Takahashi, N. (2013). Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models. Cell Death Differ. *20*, 185–187.

Vercauteren, K., de Jong, Y.P., and Meuleman, P. (2014). HCV animal models and liver disease. J. Hepatol. *61*, S26–S33.

Waggoner, S.N., Cornberg, M., Selin, L.K., and Welsh, R.M. (2012). Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. Nature *481*, 394–398.

Wagner, C.A., Lang, F., and Bröer, S. (2001). Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *281*, C1077–C1093.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nat. Med. *11*, 791–796.

Wang, N., Liang, Y., Devaraj, S., Wang, J., Lemon, S.M., and Li, K. (2009). Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. J. Virol. *83*, 9824–9834.

Wang, Y., Lawson, M.A., Dantzer, R., and Kelley, K.W. (2010a). LPS-induced indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated in an interferon-gamma-independent manner by a JNK signaling pathway in primary murine microglia. Brain. Behav. Immun. *24*, 201–209.

Wang, Y., Liu, H., McKenzie, G., Witting, P.K., Stasch, J.-P., Hahn, M., Changsirivathanathamrong, D., Wu, B.J., Ball, H.J., Thomas, S.R., et al. (2010b). Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. Nat. Med. *16*, 279–285.

Ward, S.M., Fox, B.C., Brown, P.J., Worthington, J., Fox, S.B., Chapman, R.W., Fleming, K.A., Banham, A.H., and Klenerman, P. (2007). Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. J. Hepatol. *47*, 316–324.

Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., and Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. Gastroenterology *140*, 1334–1344.

Wedemeyer, H., He, X.-S., Nascimbeni, M., Davis, A.R., Greenberg, H.B., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Alter, H., and Rehermann, B. (2002). Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *169*, 3447–3458.

Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., and Wachter, H. (1989). Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro. Biochim. Biophys. Acta *1012*, 140–147.

Williams, B.R. (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. Oncogene *18*, 6112–6120.

Wilson, L.E., Torbenson, M., Astemborski, J., Faruki, H., Spoler, C., Rai, R., Mehta, S., Kirk, G.D., Nelson, K., Afdhal, N., et al. (2006). Progression of liver fibrosis among injection drug users with chronic hepatitis C. Hepatol. Baltim. Md *43*, 788–795.

Witkiewicz, A., Williams, T.K., Cozzitorto, J., Durkan, B., Showalter, S.L., Yeo, C.J., and Brody, J.R. (2008). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection. J. Am. Coll. Surg. *206*, 849–854; discussion 854–856.

Witkiewicz, A.K., Costantino, C.L., Metz, R., Muller, A.J., Prendergast, G.C., Yeo, C.J., and Brody, J.R. (2009). Genotyping and expression analysis of IDO2 in human pancreatic cancer: a novel, active target. J. Am. Coll. Surg. *208*, 781–787; discussion 787–789.

Wölk, B., Büchele, B., Moradpour, D., and Rice, C.M. (2008). A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. J. Virol. *82*, 10519–10531.

Wose Kinge, C.N., Espiritu, C., Prabdial-Sing, N., Sithebe, N.P., Saeed, M., and Rice, C.M. (2014). Hepatitis C virus genotype 5a subgenomic replicons for evaluation of direct-acting antiviral agents. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 5386–5394.

Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. PLoS Pathog. *6*, e1001087.

Wu, J., and Chen, Z.J. (2014). Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. Annu. Rev. Immunol. *32*, 461–488.

Xiao, F., Fofana, I., Heydmann, L., Barth, H., Soulier, E., Habersetzer, F., Doffoël, M., Bukh, J., Patel, A.H., Zeisel, M.B., et al. (2014). Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. PLoS Pathog. *10*, e1004128.

Yadav, M.C., Burudi, E.M.E., Alirezaei, M., Flynn, C.C., Watry, D.D., Lanigan, C.M., and Fox, H.S. (2007). IFN-gamma-induced IDO and WRS expression in microglia is differentially regulated by IL-4. Glia *55*, 1385–1396.

Yamazaki, F., Kuroiwa, T., Takikawa, O., and Kido, R. (1985). Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. Biochem. J. *230*, 635–638.

Yan, C., Sehgal, P.B., and Tamm, I. (1989). Signal transduction pathways in the induction of 2',5'-oligoadenylate synthetase gene expression by interferon alpha/beta. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *86*, 2243–2247.

Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., and Onoé, K. (2009). Co-operative action of interleukin-10 and interferon-gamma to regulate dendritic cell functions. Immunology *127*, 345–353.

Yang, B., Guo, M., Herman, J.G., and Clark, D.P. (2003). Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. Am. J. Pathol. *163*, 1101–1107.

Yao, Z.Q., Praythер, D., Trabue, C., Dong, Z.P., and Moorman, J. (2008). Differential regulation of SOCS-1 signalling in B and T lymphocytes by hepatitis C virus core protein. Immunology *125*, 197–207.

Yeung, A.W.S., Wu, W., Freewan, M., Stocker, R., King, N.J.C., and Thomas, S.R. (2012). Flavivirus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocyte-derived macrophages via tumor necrosis factor and NF-κB. J. Leukoc. Biol. *91*, 657–666.

Yi, M., Ma, Y., Yates, J., and Lemon, S.M. (2007). Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. J. Virol. *81*, 629–638.

Yoshida, N., Ino, K., Ishida, Y., Kajiyama, H., Yamamoto, E., Shibata, K., Terauchi, M., Nawa, A., Akimoto, H., Takikawa, O., et al. (2008). Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 7251–7259.

Yoshida, R., Urade, Y., Tokuda, M., and Hayaishi, O. (1979). Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *76*, 4084–4086.

Young, S.N., and Leyton, M. (2002). The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels. Pharmacol. Biochem. Behav. *71*, 857–865.

Yu, M., Corsa, A.C., Xu, S., Peng, B., Gong, R., Lee, Y.-J., Chan, K., Mo, H., Delaney, W., and Cheng, G. (2013). In vitro efficacy of approved and experimental antivirals against novel genotype 3 hepatitis C virus subgenomic replicons. Antiviral Res. *100*, 439–445.

Yu, M., Peng, B., Chan, K., Gong, R., Yang, H., Delaney, W., and Cheng, G. (2014). Robust and persistent replication of the genotype 6a hepatitis C virus replicon in cell culture. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 2638–2646.

Yuasa, H.J., Takubo, M., Takahashi, A., Hasegawa, T., Noma, H., and Suzuki, T. (2007). Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases. J. Mol. Evol. *65*, 705–714.

Zhang, Y., Kang, S.A., Mukherjee, T., Bale, S., Crane, B.R., Begley, T.P., and Ealick, S.E. (2007). Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolinate biosynthesis. Biochemistry (Mosc.) *46*, 145–155.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 9294–9299.

Zhou, Y., Zhang, Y., Yao, Z., Moorman, J.P., and Jia, Z. (2012). Dendritic cell-based immunity and vaccination against hepatitis C virus infection. Immunology *136*, 385–396.

Zhu, W.H., Lu, C.Z., Huang, Y.M., Link, H., and Xiao, B.G. (2007). A putative mechanism on remission of multiple sclerosis during pregnancy: estrogen-induced indoleamine 2,3-dioxygenase by dendritic cells. Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl. *13*, 33–40.

Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H.J., Barnes, A., Florentin, J., Tawar, R.G., Xiao, F., Turek, M., et al. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. Cell Host Microbe *13*, 302–313.

(2013). Fields virology (Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health).

Sites Internet et rapports d'experts:

ICTV Virus Taxonomy 2013 : http://www.ictvonline.org

ICTV Files and Discussions : www.talk.ictvonline.org

http://deainfo.nci.nih.gov/advisory/ctac/workgroup/_IRM%20Prioritization%20Working%20Group%20FINAL%20REPORT

Annexe I

Communication orale :

Lepiller Q, Soulier E, Fuchs D, Baumert T, Stoll-Keller F, Barth H. Role of hepatic IDO expression in HCV infection.

33rd International Winter-Workshop on Clinical, Chemical and Biochemical Aspects of Pteridines and Related Topics, Innsbruck, Austria, 2014

Communication affichée :

Lepiller Q, Soulier E, Lambotin M, Barths J, Bachellier P, Stoll-Keller F, Baumert TF, Liang TJ, Barth H. Human hepatocyte indoleamine-2,3-dioxygenase contributes to antiviral defense and immune regulation in hepatitis C virus infection.

48th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam, 2013

Annexe II

Publication :

Lepiller Q *et al.* Antiviral and immunoregulatory effects of indoleamine-2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection

J Innate Immun, DOI: 10.1159/000375161

Antiviral and immunoregulatory effects of indoleamine-2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection

Running title: HCV infection and tryptophan catabolizing enzymes

Quentin Lepiller [1,2,3], Eric Soulier[2,3], Qisheng Li[4], Mélanie Lambotin[5], Jochen Barths[5], Dietmar Fuchs[6], Françoise Stoll-Keller[1,2,3], T. Jake Liang[4], and Heidi Barth[1,2,3*]*

[1]Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, [2]Inserm U1109, [3]Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, France ; [4]Liver Diseases Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH, Bethesda, MD, USA ; [5]Inserm U1110, Strasbourg, France ; [6]Division of Biological Chemistry Biocentre, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

*Co-corresponding authors:

Heidi Barth, Laboratoire de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France, Tel. ++33 369 55 15 48, FAX ++33 368 85 37 50, E-Mail: barth@unistra.fr and T. Jake Liang, NIH, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Liver Diseases Branch, NIH, Bethesda, MD 20892, USA, E-Mail: JakeL@bdg10.niddk.nih.gov

Abstract

In patients with hepatitis C virus (HCV) infection, enhanced activity of indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO) has been reported. IDO - a tryptophan-catabolizing enzyme – has been considered as both an innate defence mechanism and an important regulator of the immune response. The molecular mechanism of IDO induction in HCV infection and its role in the antiviral immune response remain unknown. Using primary human hepatocytes, we show that HCV infection stimulates IDO expression. IDO gene induction was transient and coincided with the expression of type I and type III interferons (IFNs) and IFN-stimulated genes (ISGs) in HCV-infected hepatocytes. Overexpression of hepatic IDO prior to HCV infection markedly impaired HCV replication in hepatocytes, suggesting that IDO limits the spread of HCV within the liver. siRNA-mediated IDO knockdown revealed that IDO functions as an IFN-mediated anti-HCV effector. Hepatic IDO was most potently induced by IFN-γ and ongoing HCV replication could significantly upregulate IDO expression. IRF1 and STAT1 regulated hepatic IDO expression. Hepatic IDO expression also had a significant inhibitory effect on CD4+ T cell proliferation. Our data suggest that hepatic IDO plays a dual role during HCV infection by retarding viral replication and also regulating host immune responses.

Key words: indoleamine-2,3-dioxygenase, hepatocyte, hepatitis C virus, antiviral immune response

Introduction

Hepatitis C virus (HCV), a member of the *Flaviviridae* family, is one of the most important causes of chronic liver disease which may lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. Hepatic innate immunity is the first line of defence against HCV and plays a crucial role in the initiation and modulation of adaptive immune responses [2]. Although the initiated immune response can clear HCV, the majority of acutely-infected individuals develop persistent infection. Persistence of HCV has been ascribed to HCV escape mutations and impaired innate and adaptive immune responses through mechanisms that are not yet fully understood (reviewed in [2] and [3]).

Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO) is an enzyme that metabolizes tryptophan to kynurenine which can be further metabolized to various downstream catabolites, such as 3-hydroxykynurenine. IDO is induced mainly by type II interferons (IFN-γ) and to a lesser extent by type I IFNs (IFN-α/β) and other inflammatory cytokines in human tissues and cell subsets [4]. IDO has been considered to be part of the host's innate defence mechanism as it can control pathogen proliferation by depleting tryptophan from the local microenvironment [5]. Nutrient deprivation is an evolutionarily ancient but important strategy of the innate host defence. IDO-mediated tryptophan depletion in cell culture models has been shown to inhibit replication of various viruses, such as herpes simplex virus, hepatitis B virus, and flaviviruses [6-8].

Previous research has demonstrated that IDO plays a crucial role in immunological homeostasis [9] and pathogen persistence [10]. CD4+ T cells are very sensitive to tryptophan shortage and accumulation of kynurenine catabolites which cause their arrest in the G1 phase of the cell cycle, anergy and even apoptosis. For example, IDO-producing dendritic

cells (DCs) inhibit T cell activation and proliferation or induce T regulatory (Treg) cells through tryptophan starvation and/or formation of immunotoxic kynurenine catabolites, such as 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid [4]. *In vitro* studies have shown that HIV stimulates IDO expression in DCs [11]. Moreover, during HIV infection, IDO is overexpressed in lymphoid tissue and parallels with the accumulation of Treg cells [12] suggesting that activation of IDO facilitates HIV persistence.

An increased serum kynurenine to tryptophan ratio, which is an index for IDO activity, has been previously demonstrated in patients with chronic HCV infection when compared to patients with resolved HCV infection and healthy individuals [13-16]. Studies in HCV-infected chimpanzees showed that IDO mRNA expression is upregulated in the liver during the acute phase of infection but returns rapidly to baseline levels in chimpanzees that subsequently cleared the infection. In contrast, chimpanzees that developed persistent infection maintained high level of hepatic IDO mRNA expression [14,17]. However, the molecular mechanism of IDO induction in HCV infection and its impact on anti-HCV effector functions remains poorly defined.

In this study, we show that hepatic IDO expression exerts inhibitory effects on both HCV replication and immune cells. The dichotomous nature of IDO may favour persistence within the host over viral eradication.

Materials and methods

Cells, reagents, and antibodies

Human Huh7.5.1 cells were kindly provided by Dr. F. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA; MTA number 636) [18]. PHH were provided by Stephen Strom of University of Pittsburgh through the Liver Tissue Procurement and Distribution System (N01-DK-7-0004/HHSN26700700004C). PHH were isolated from liver resections according to standard perfusion protocols. After seven days of culture, PHH remained attached and maintained a healthy and highly differentiated phenotype. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy blood donors (EFS-Alsace, Strasbourg, France) by Ficoll density gradient centrifugation. CD4+ T cell positive selection was performed by magnetic sorting using CD4+ microbeads (Miltenyi Biotech). Human recombinant IFN-α and IFN-γ were obtained from Roche and Intermune, respectively. Rabbit polyclonal anti-IDO1 (Abcam), anti-β actin (Abcam), anti-IRF1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-STAT1 and anti-STAT1 (Tyr701) antibody (Cell Signaling) were used for Western blot analysis. PE-conjugated mouse anti-human IFN-γR, anti-HCV core (clone C7-50, Thermo Scientific) and anti-IRF1 antibodies were used for flow cytometry analysis. The IDO inhibitor 1-DL-MT, a racemic mixture of 1-methyl-tryptophan comprising both isomers (D+L), was purchased from Sigma-Aldrich.

Viruses

Production of HCV pseudoparticles (HCVpp) bearing envelope glycoproteins of strains HCV-J (1b) and JFH1 (2a), and production of vesicular stomatitis virus pseudoparticles (VSVpp) has been described previously [19]. HCVpp were added to Huh7.5.1 cells for 3h at 37°C. HCVpp infection was determined by measuring luciferase activity 72 hours post-infection. HCVpp entry was assessed with a luciferase assay system (Promega) using a Mithras LB940 plate reader (Berthold Technologies). Production of cell-culture-derived HCV (HCV JFH1 strain kindly provided by Dr. T. Wakita of the National Institute of Infectious Disease,

Tokyo, Japan, MTA number 1664) has been described previously [20]. For infection experiments, Huh7.5.1 cells and PHH were infected with JFH1 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.05 and 0.1, respectively, for 3 hours at 37°C to allow HCV entry. HCV JFH1 infection efficiency of PHH ranged from 4 to 7 RNA copies per hepatocyte. PHH were infected with 50 µl of serum derived from a patient infected with HCV genotype 1b (viral load of 6.68 x 10^5 IU/ml) who had participated in an HCV clinical trial (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00638144). The cells were then washed with a heparin solution (60 µg/ml) to remove surface-bound viral particles followed by two washes in PBS. JFH1 infection was analyzed in cell lysates by quantification of viral RNA at different time points post-infection. HCV RNA copy numbers were determined by real-time quantitative RT-PCR, as described previously [21]. Ultraviolet (UV)-inactivated JFH1 virus was produced by placing 2 ml of JFH1 under a Vilber UV lamp (VL-115.M) for 20 minutes. UV-inactivated virus was non-infectious as determined by titration on naïve Huh7.5.1 cells.

Real-Time RT-PCR analysis

RNA was extracted from cell samples using the RNeasy Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using a cDNA reverse transcription kit (Fermentas). PCR was performed using TaqMan probe-based chemistry. The qPCR reaction mix was incubated for 5 min at 95°C and 10 min at 50°C followed by 40 PCR cycles, with each cycle comprising 95°C for 15 s and 60°C for 1 min (Rotor-Gene 6000, Corbett Life Science). Primers and internal probes for IDO1, IDO2, CXCL10 chemokine, signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), interferon-regulatory factor 1 (IRF1), melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5), double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR), IFN-α, IFN-β, IFN-λ, claudin-1, and GAPDH were purchased from Applied Biosystems. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a reference gene for normalization of quantitative PCR data.

Immunoblotting

Proteins (5-10 µg) were loaded onto a 10% SDS-PAGE gel. The separated proteins were transferred onto PVDF membranes. The membrane was incubated with primary antibody for 2h, followed by incubation with secondary antibody (IgG horse-radish peroxidase conjugated, from Pierce) for 1h at room temperature. The membrane was developed with ECF Western blotting detection reagent (Amersham Biosciences) and visualized with an image analyzer (Typhoon^{TM} Trio, GE Healthcare). Quantitative densitometric analyses were performed on digitized images using ImageQuant software (GE Healthcare).

Staining of surface and intracellular antigens by flow cytometry

For analysis of cell-surface antigens, cells were stained with fluorochrome-labeled antibodies (PE-conjugated mouse anti-human IFN-γR, BD Biosciences). For analysis of intracellular antigens, cells were permeabilized using Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). The cells were incubated with primary antibodies (anti-HCV core or anti-IRF1 antibody) for 45 min, followed with fluorochrome-labeled antibodies (Alexa555 or PE-conjugated secondary antibody, BD Biosciences) for 30 min. Antigen expression was analyzed on a LSRII flow cytometer using DIVA software (BD Biosciences).

T cell proliferation assay

T cell proliferation assays were performed by staining cells with CellTrace CFSE cell proliferation dye (Invitrogen). The percentages of cells in different generations were calculated using ModFit LT for Win32 (Verity Software House, Topsham). The proliferation index (PI) was calculated according to the ModFit program and represents the sum of the cells in all generations divided by the computed number of original parent cells present at the start of the experiments. The PI is proportional to the percentage of cells that have

proliferated in culture and is also weighted for the number of divisions that cells have undergone.

Transient transfection and RNA-mediated interference

Huh7.5.1 cells were transfected with either pcDNA3.1 encoding full-length human IDO cDNA (pcDNA IDO) [22], IRF1 cDNA (InvivoGene), or pcDNA3.1 (vector control, Invitrogen) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. PHH were transfected using Lipofectamine™ LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The siRNAs directed against IRF1 consist of pools of 4 individual siRNAs (Smartpool) and were obtained from Dharmacon Research, as was the control siRNA GLO (si Control). Huh7.5.1 cells were transfected with 50nM of either the IRF1-targeting siRNA pool or the control siRNA GLO using Dharmafect 4 siRNA-transfection reagent (Dharmacon Research) according to manufacturer's instruction. At 48h post-transfection, Huh7.5.1 cells were stimulated with IFN-γ (50 IU/ml) for 7h.

Measurement of IDO activity

IDO functional activity was measured in terms of the ability of cells to catabolize exogenous tryptophan (100 µM; Sigma Aldrich) to kynurenine by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), as detailed previously [23]. Alternatively, kynurenine was measured spectrophotometrically using the Ehrlich reagent method, as described previously [24]. The values were compared with a standard curve with defined concentrations of kynurenine (0-100 µM; Sigma Aldrich). IFN-γ-stimulated PHH or IDO-transfected Huh7.5.1 cells were washed and resuspended in HBSS buffer containing 100 µM tryptophan. After 4h, supernatants were harvested and assessed for the presence of kynurenine. The IDO specific inhibitor, 1-DL-MT, was used to block IDO activity.

Co-culture conditions

Isolated CD4+ T cells were labelled with CFSE (10 µM) and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28-coated beads (Invitrogen) at a bead-to-cell ratio of 1:1 in the presence of IL-2 (30 IU/ml, Invitrogen) 48h prior to co-culture. Then, CFSE-labelled and activated CD4+ T cells were co-cultured with IDO-transfected Huh7.5.1 cells at a ratio of 1:1. After 72 h of co-culture, CD4+ T cells were collected and their proliferative responses were analyzed by flow cytometry as described above. As a control, some cultures were supplemented with 1-DL-1MT (1000 µM) at the time of co-culture.

Determination of IDO mediated anti-HCV activity

Huh7.5.1 cells were transfected with siRNAs targeting the type I IFN receptor 2 (IFNαR2), with siRNAs targeting IDO, or with non-targeting control siRNAs (NT) at a final concentration of 50 nM, using a reverse-transfection protocol with Oligofectamine (Invitrogen) as described previously [25]. After 72h, cells were infected with HCV JFH1. At 24h post-infection, cells were either mock-treated or treated with INF-α at 10 IU/ml. Twenty-four hours after IFN-α treatment, cells were harvested, and total cellular RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). For the IDO gene-expression assay, complementary DNA (cDNA) was synthesized from total cellular RNA using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). The mRNA levels of IDO were measured by quantitative RT-PCR using IDO-specific primers and probes (IDT) on an ABI 7500 Real Time PCR System. Relative IDO mRNA levels were calculated by ΔΔCT method, and were normalized by 18S rRNA levels (Applied Biosystems). Copy numbers of intracellular HCV RNA were measured by quantitative RT-PCR with the primers, probe, and parameters described previously [26]. The relative amount of HCV RNA was normalized to 18S rRNA.

Statistical analysis

Unpaired T tests were used to analyse data and compare different conditions. Data are expressed as means ± SD, and P values less than 0.05 were considered significant.

Results

Primary human hepatocytes express an enzymatically active IDO

Hepatocytes are the primary target cells supporting HCV replication and provide the first line of immune defence against HCV. We thus explored the capacity of primary human hepatocytes (PHH) to produce a functional IDO protein. PHH from two different donors were stimulated with different doses of type I and II IFNs. As shown in Fig. 1, IFN-γ markedly enhanced IDO mRNA expression in a dose-dependent manner, reaching a plateau at 100 IU/ml. IDO was prominently induced by IFN-γ, while IFN-α had a much weaker effect on IDO mRNA expression (Fig. 1A). Western blot analysis confirmed the expression of IDO protein in PHH. IFN-γ-induced IDO protein expression was detectable through 3 days in PHH (Fig. 1B). To confirm that IDO is functional in PHH, we monitored the degradation of exogenous tryptophan to kynurenine by HPLC. Kynurenine production was observed in IFN-γ-stimulated PHH and the presence of the IDO inhibitor 1-DL-MT abolished IDO activity (Fig. 1C), indicating that hepatic IDO protein is enzymatically active.

HCV stimulates IDO expression in primary human hepatocytes

Although hepatocytes are the primary target cells of HCV *in vivo*, *in vitro* infection of primary human hepatocytes (PHH) remains a difficult task. Here we took advantage of the development of recombinant cell-culture-derived HCV JFH1 virus [20] to evaluate IDO expression in PHH. PHH were exposed to infectious JFH1 virus and replication-deficient JFH1. As shown in Fig. 2 and consistent with previous publications [27,28], limited replication of JFH1 in PHH was detected over 24-96h, suggesting that innate antiviral host defenses produced an antiviral state restricting HCV replication and spread in PHH. Using a qRT-PCR approach we detected a robust increase in IDO mRNA expression within 48 hours of infection that co-incided with JFH1 replication, the expression of CXCL10, IFN-α, IFN-β, and IFN-λ, as well as the induction of interferon-stimulated genes (ISGs), such as STAT1, IRF1, MDA5 and PKR. In contrast, JFH1 infection did not stimulate the expression of IDO2, a

paralog of IDO [29], and claudin-1, a tight junction protein and a putative receptor for HCV entry [30]. Gene induction was dependent on HCV replication, as UV-inactivated non-infectious JFH1 had little if any effect on gene expression (Fig. 2). These results suggest that HCV replication drives hepatic IDO expression together with proteins that exhibit significant antiviral properties.

IRF1 regulates HCV-induced hepatic IDO expression

Since HCV replication is transient in primary liver cells (Fig. 2 and [27,28]), we used the Huh7-derived cell-culture system [20] to gain a deeper insight into the molecular mechanism of HCV-induced IDO. As shown in Fig. 3A, at day 5 after JFH1 exposure almost all Huh7.5.1 cells were infected, as evidenced by the presence of HCV core-positive cells during flow-cytometry analysis. Expression of IDO mRNA was very low or undetectable in uninfected Huh7.5.1 cells (Fig. 3B). As in PHH, JFH1 infection and IFN-γ stimulated IDO expression in Huh7.5.1 cells (Fig. 3B). Furthermore, IFN-γ significantly upregulated IDO expression in JFH1-infected Huh7.5.1 cells (Fig. 3B) and to a similar extent as that observed previously in Huh7 cells by Larrea and colleagues [14]. To exclude the possibility that this enhancement was the direct result of greater IFN-γ receptor density on the cell surface of JFH1 infected Huh7.5.1 cells, we determined IFN-γ receptor α chain expression levels using flow cytometry. As expected, there was no difference between JFH1-infected Huh7.5.1 cells and non-infected control Huh7.5.1 cells (Fig. 3C). However, we failed to detect IDO at the protein level in Huh7.5.1 cells by Western blot (data not shown), probably because IDO is expressed at very low levels in these cells. Of note, levels of IDO gene transcription were extremely low in Huh7.5.1 cells compared to PHH in the presence or absence of IFN-γ (Fig. 3D).

Because IRF1 is an IFN-γ-induced transcriptional activator critical for IDO regulation [31], we investigated IRF1 mRNA expression level in Huh7.5.1 cells in the presence and

absence of JFH1 infection. JFH1-infected cells demonstrated an approximately 1 log higher IRF1 mRNA expression compared to uninfected control cells (Fig. 4A). IFN-γ treatment of JFH1-infected cells further increased IRF1 expression level (Fig. 4A). Analysis of IRF1 protein expression by flow cytometry confirmed the presence of increased amounts of IRF1 protein in JFH1-infected Huh7.5.1 cells compared to uninfected cells upon IFN-γ treatment (Fig. 4B). To demonstrate that IRF1 is a critical factor in hepatic IDO expression, we transiently overexpressed the human IRF1 gene in Huh7.5.1 cells. As shown in Fig. 4C, IRF1 overexpression alone stimulated the expression of IDO mRNA in Huh7.5.1 cells. siRNA-mediated knockdown of IRF1 abrogated almost completely IFN-γ induced IDO expression in Huh7.5.1 cells (Fig. 4D), indicating that IRF1 regulates hepatic IDO expression.

A subgroup of genes induced by IFN-γ requires both IRF1 and STAT1 for transcriptional activation. Previous studies have shown that full activation of STAT1 is crucial for IFN-γ-induced IDO expression in murine dendritic cells [32]. We, therefore, studied levels of STAT1 expression and activation in JFH1-infected Huh7.5.1 cells. As shown in Fig. 4E-F, STAT1 mRNA and protein expression did not markedly differ between JFH1-infected and control Huh7.5.1 cells in the absence or presence of IFN-γ. However, we observed that IFN-γ-induced STAT1 tyrosine phosphorylation was prolonged in JFH1-infected Huh7.5.1 cells compared with uninfected Huh7.5.1 control cells, even though JFH1 infection *per se* was not able to promote virtually detectable STAT1 phosphorylation. Prolonged phosphorylation of STAT1 may contribute to enhanced upregulation of IFN-γ-induced IDO expression in JFH1-infected Huh7.5.1 cells.

Antiviral activity of hepatic IDO in HCV infection

To determine whether hepatic IDO has an impact on HCV replication, we transiently overexpressed the human IDO gene in Huh7.5.1 cells and PHH prior to HCV exposure. At

48h post-transfection, IDO was expressed at the protein level in Huh7.5.1 cells and PHH (Fig. 5A). Enzymatic activity of the expressed IDO protein was verified by the production of kynurenine in the cell culture supernatant (Fig. 5A). In an additional experiment, we demonstrated that the IDO inhibitor 1-DL-MT inhibited IDO-mediated tryptophan-to-kynurenine conversion in a dose-dependent manner without causing cytotoxic effects on IDO-transfected Huh7.5.1 cells (Fig. 5A). To assess whether IDO has an effect on HCV entry, we studied HCV pseudoparticle (HCVpp) entry into Huh7.5.1 cells and PHH. As shown in Fig. 5B, transient IDO over-expression did not inhibit HCVpp entry in Huh7.5.1 cells and PHH indicating that IDO does not prevent the virus from entering the cells based on the HCVpp system. However, we cannot completely rule out an effect on entry because recent studies suggest that the HCVpp system does not completely reproduce all the steps of HCV entry [33]. Expression of IDO reduced HCV replication up to 50% in JFH1-infected Huh7.5.1 cells and PHH (Fig. 5C). Similar results were observed in Huh7.5.1 cells co-transfected with a JFH1 subgenomic replicon (data not shown) or PHH exposed to serum-derived HCV (genotype 1b) (Fig. 5C) indicating that IDO attenuates HCV replication. To assess whether IDO's antiviral activity relies on its catalytic function, we added the IDO inhibitor 1-DL-MT to the cell cultures. As shown in Fig. 5D, the presence of 1-DL-MT restored HCV replication to normal level in JFH1-infected Huh7.5.1 cells. These results suggest that IDO's antiviral activity is mediated by tryptophan shortage and/or accumulation of kynurenine.

IDO mediates antiviral effects of interferons.

To investigate whether IDO participates in innate immune responses to HCV, we performed IDO siRNA-knockdown experiments in Huh7.5.1 cells. As shown in Fig. 6A, siRNA-treated cells were subsequently challenged with JFH1 virus and a suboptimal dose of IFN-α (10 IU/ml). Treatment of cells with suboptimal doses of IFN-α has been necessary since higher doses of IFN-α would minimize the siRNA effect. Efficient siRNA transfection and knockdown of IDO in Huh7.5.1 cells was monitored at day five after transfection by qRT-PCR. We

observed at this time point a target-gene knockdown of 70%, a value still considered to be highly efficient (Fig. 6B). As shown in Fig. 6C, IFN-α at suboptimal dose decreased HCV replication by 50% in Huh7.5.1 cells. Downregulation of HCV replication was IFN-α dependent, as evidence by rescue of HCV replication in Huh7.5.1 cells following type I IFN receptor 2 (IFNαR2) siRNA knockdown. IDO siRNA knockdown also reversed IFN-α-mediated suppression of HCV replication, indicating that IDO is an ISG with anti-HCV activity.

Hepatic IDO modulates CD4+ T-cell proliferation

IDO-expressing dendritic cells have a crucial role in down-regulation of immune responses [4]. To investigate whether hepatic IDO has similar effects on immune cells, we performed co-culture experiments in which naïve or activated CD4+ T lymphocytes were cultured in the presence of IDO-transfected Huh7.5.1 cells. As shown in Fig. 7A, the presence of IDO-transfected Huh7.5.1 cells or control cells transfected with the empty vector did not have an effect on naïve CD4+ T cells. In contrast, the presence of IDO-expressing Huh7.5.1 cells significantly reduced the proliferation of anti-CD3/CD28 stimulated CD4+ T lymphocytes when compared to control cells (Fig. 7A-B). These results suggest that IDO expressed in hepatocytes plays an important role in the regulation of hepatic immune responses. Addition of the IDO inhibitor 1-DL-MT during the co-culture experiment partially rescued CD4+ T cell proliferation (Fig. 7B). The incomplete reversal of suppression by 1-DL-MT might be due to the fact that 1-DL-MT-mediated blockage was incomplete, as evidenced by the production of kynurenine of IDO-transfected Huh7.5.1 cells in the presence of 1000 µM 1-DL-MT (Fig. 5A).

Discussion

The present study shows that IDO is transiently expressed in HCV-infected hepatocytes and coincides with an increase in IFNs and ISGs, suggesting that IDO participates in innate anti-

HCV immune mechanisms. Indeed, we found that HCV replication is less efficient in Huh7.5.1 cells overexpressing IDO. Furthermore, we were able to recapitulate these findings in PHH although the level of IDO transfection and HCV JFH1 infection in these cells were very low compared with Huh7.5.1 cells. Our findings are in line with recent studies showing that overexpression of IDO prior to infection with West Nile virus (WNV), a mosquito-borne flavivirus, significantly inhibited WNV replication via tryptophan starvation [8]. In addition, Mao and colleagues demonstrated that IDO inhibited hepatitis B virus replication via tryptophan deprivation [7]. Since tryptophan shortage restricts mammalian cell growth and viral replication is dependent on the host cell metabolic machinery, a tryptophan-deficient intracellular environment is presumably less favourable for HCV replication. Type I IFN production by the infected hepatocyte serves as the first line of host defense against HCV and current evidence suggests that IFN-mediated anti-HCV activity is performed by the combined action of multiple ISGs [28,34]. To investigate whether IDO is an ISG with anti-HCV activity, cells with silenced IDO gene expression were exposed to IFN-α at a suboptimal dose to avoid minimizing siRNA efficiency. Knockdown of IDO rescued HCV replication in Huh7.5.1 in the context of IFN-α treatment suggesting that IDO contributes to the suppression of HCV replication mediated by IFNs. Our findings are in line with *in vivo* studies that showed a transient upregulation of hepatic IDO during the acute phase of HCV infection in chimpanzees that spontaneously cleared HCV infection [14].

HCV infection triggered IRF1 expression in hepatocytes and Huh7.5.1 cells. Gene-expression profiling of JFH-1-infected Huh7 cells by microarray analysis also demonstrated an increase in IRF1 expression [35]. In addition, IRF1 mRNA expression levels have been shown to be upregulated in liver biopsy samples from HCV-infected patients [36]. IRF1 is a pleiotropic transcription factor with anti-viral, anti-proliferative, and pro-apoptotic properties. IRF1 regulates expression of several ISGs, such as PKR and 2',5'-oligoadenylate synthetase [31]. Previous studies have suggested that IRF1 is one of the key cellular factors that

regulates intracellular HCV replication [37]. Of note, we observed a substantial increase in the level of HCV replication in JFH1-infected Huh7.5.1 cells following partial IRF1 gene silencing (data not shown). It has been previously shown that the IDO promoter contains a putative binding site for IRF1 [38]. Overexpression of IRF1 alone was sufficient to up-regulate IDO expression in Huh7.5.1 cells. On the other hand, partial silencing of IRF1 gene in Huh7.5.1 cells abolished IFN-γ-induced IDO expression. These findings suggest that IDO expression in HCV-infected cells is driven by IRF1. IRF1 can be induced by many stimuli, including IFNs (-α, -β, -γ), TNF-α, IL-6, and viral infections. Positive-feedback regulation of IFN-β expression by IRF1 has been also observed, suggesting a complex gene network in the regulation of the IFN pathway by IRF1 [31]. The double-stranded RNA (dsRNA) replication intermediate of HCV is recognized in the infected hepatocyte through the combined action of multiple pathways, including PKR, retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like helicases and Toll-like receptor 3 (TLR-3) pathways, that ultimately leads to the induction of type I IFNs or pro-inflammatory cytokines [2]. Thus, it is possible that HCV-induced IFN production triggers IRF1 production in hepatocytes. However, a detailed analysis of the underlying mechanism in this study is hampered by the fact that Huh7.5.1 cell lines are highly adapted, with defects in RIG-I and TLR3 pathway signalling [39] that allow high levels of HCV replication by impairing innate immunity.

IDO mRNA expression was most potently induced by IFN-γ in hepatocytes and Huh7.5.1 cells. IFN-γ-induced IDO was enzymatically active in hepatocytes, as evidenced by the production of kynurenine, the main metabolite of tryptophan. However, we were unable to detect IDO protein expression in IFN-γ-stimulated Huh7.5.1 cells by Western blot, suggesting that IDO is expressed at low levels in these cells. Absence of detectable IDO protein signal in Huh7.5.1 cells may also be explained by the IDO gene's very low transcription rate in these cells compared to PHH. Ongoing HCV replication in Huh7.5.1 cells significantly upregulated IFN-γ-induced IDO expression. Similar effects on IFN-γ-induced IDO expression have been

previously reported in Huh7 cells by Larrea and colleagues [14]. In their study, IFN-γ-induced IDO mRNA expression was analysed for up to 40 hours post IFN-γ treatment. Interestingly, IDO mRNA expression level remained significantly upregulated until this time point when compared to uninfected control cells, suggesting that IFN-γ induces a sustained IDO expression in HCV-infected hepatocytes. Cooperative binding of IRF1 and STAT1 to the IDO promoter appears to play an important role in the regulation of IDO gene expression [32]. IFN-γ mediated IRF-1 expression is driven primarily by phosphorylated STAT1 homodimers [40]. Analysis of phospho-STAT1 levels demonstrated prolonged STAT1 phosphorylation in JFH1-infected Huh7.5.1 cells in the presence of IFN-γ. Delayed dephosphorylation of activated STAT1 in JFH1-infected Huh7.5.1 cells may sustain IRF1 expression as well as IDO. Although further studies are necessary to support this hypothesis, prolonged phosphorylation in the presence of IFN-γ in virus-infected cells has been described for Sindbis virus, an enveloped plus strand, mosquito-borne ARN virus [41] and, most recently, for cytomegalovirus [42]. Finally, adenovirus has been shown to prolong phosphorylation of STAT1 induced by IFN-α in infected cells by inhibiting STAT1 dephosphorylation [43] .

IFN-γ production is mainly attributed to natural killer cells and activated T cells which play key roles in innate and adaptive immune responses, respectively. Previous studies showed that co-culture of IFN-γ-producing T cells with HCV-infected Huh7 cells resulted in 100-fold higher IDO levels than in experiments using exogenous IFN-γ alone [14]. However, whether induced hepatic IDO exerts immunoregulatory effects upon innate and adaptive immune cells was not investigated. In the present study, we found that hepatic IDO expression significantly inhibited the proliferation of activated CD4+ T cells, suggesting that HCV-infected hepatocytes in an IFN-γ rich environment are capable of exerting a negative feedback loop on CD4+ T cells. Further studies are necessary to address the underlying mechanism of hepatic IDO-mediated inhibition. Shortage in tryptophan supply combined with the production of kynurenine pathway metabolites have been associated with the emergence

of a regulatory phenotype in naïve $CD4^+CD25^-$ T cells affecting CD4+ as well as CD8+ T cell function [44]. Downstream kynurenine pathway metabolites, such as 3-hydroxyanthranilic acid, have also been described as causing dysfunction of activated T cells, T cell anergy and even apoptosis [4]. Whether hepatocytes possess the enzymatic machinery to further metabolize kynurenine into immunomodulatory downstream metabolites remains unknown. Functional exhaustion and, ultimately, deletion of HCV-specific CD4+ T cells is a hallmark of chronic HCV infection [3]. Sustained hepatic IDO expression within the liver environment may play a role in dampening the HCV-specific T cell response. Of note, there are two other enzymes involved in tryptophan metabolism: tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) and IDO2, a paralogue of IDO [29]. IDO2 gene expression is not induced by IFNs and its function is still unclear. TDO is constitutively expressed in the liver and plays a crucial role in systemic tryptophan homoeostasis [45]. Cells expressing recombinant human TDO have been shown to inhibit T-cell proliferation and production of IFN-γ [46], suggesting that hepatic TDO might contribute to the tolerogenic properties of the liver. However, since TDO does not respond to inflammatory signals and cannot be blocked by the IDO specific inhibitor 1-DL-MT, our *in vitro* data point to a prominent role for IDO in mediating antiviral and immune regulatory effects in HCV infection.

In conclusion, we identified a dichotomous role of hepatic IDO in HCV infection. The dominant nature of this role – anti-HCV activity or immune counterregulation – in HCV infection remains to be investigated. In the early phase of HCV infection, upregulation of IDO may contribute to the host's innate antiviral defence mechanism by slowing down HCV replication. At later time points, when HCV-specific T cells are activated and accumulate in the liver, a sustained IFN-γ-induced upregulation of IDO in HCV-infected hepatocytes may counterregulate the anti-HCV T cell response and favour tolerance. In addition, IDO expression might protect hepatocytes against a possible overshooting T-cell response or might be secondary to the progressive inflammation events of the liver, which is a hallmark of

persistent HCV infection. Hepatic IDO might be beneficial in acute infection and deleterious in chronic infection. However, the question arises as to whether it is possible to potentiate IDO's contribution to anti-HCV activity and reduce its immunosuppressive effect in the chronic phase of infection. In a model of bacterial infection, Muller and colleagues [47] demonstrated that IDO-mediated antimicrobial and immunoregulatory effects require different threshold levels of tryptophan. A 10 - 40 fold greater tryptophan depletion was required to mediate an immunoregulatory effect compared to the antibacterial effect [47]. This observation, together with the fact that IDO-mediated regulation of T-cell responses is closely linked to toxic effects of kynurenine and other immunosuppressive metabolites of the kynurenine pathway [4] may provide the opportunity to modulate the IDO pathway towards favoring the antiviral effect. Thus, attenuation of IDO activity with small molecule inhibitors, such as 1MT, or inhibition of toxic kynurenine accumulation via the activation of other downstream enzymes that are involved in the production of harmless by- or end-products, may tip the balance toward IDO-mediated antiviral effects with less IDO-mediated immune suppression. However, to answer these questions an IDO knock-out mouse susceptible to HCV has to be developed. Since IDO-inhibitor drugs have already entered phase II clinical trials in cancer patients (www.clinicaltrials.gov. NCT01685255, NCT01604889), knowledge of the dominant role of IDO in acute and chronic HCV infection may pave the way for novel therapeutic intervention.

Acknowledgments

We would like to thank T. Baumert, Inserm U1110, for supporting the study and providing access to the L3 laboratory facility. We would like to thank S. Strom and his colleagues at the University of Pittsburgh for providing the primary human hepatocytes through the Liver Tissue Procurement and Distribution System (N01-DK-7-0004/HHSN26700700004C) and the team of P. Bachellier, Pôle des Pathologies Digestives, Hépatiques et Transplantation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France for providing liver resections for PHH isolation. We thank S. Durand, Inserm U1110, Strasbourg for excellent technical assistance in the isolation of PHH. We thank S. Raghuraman, Inflammation and Infection Research Centre, University of New South Wales, Sydney, Australia for helpful discussion. We thank C. Sodroski, Liver Diseases Branch, NIDDK, NIH for proofreading the manuscript. This work was supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH and Agence Nationale de la Recherche sur le Sida (2010-242 to H. B.).

References

1 Liang TJ, Heller T: Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2004;127:S62-71.

2 Horner SM, Gale M: Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. Nat Med 2013;19:879-888.

3 Rehermann B: Pathogenesis of chronic viral hepatitis: Differential roles of T cells and NK cells. Nat Med 2013;19:859-868.

4 Mellor AL, Munn DH: IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol 2004;4:762-774.

5 Pfefferkorn ER: Interferon gamma blocks the growth of toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:908-912.

6 Adams O, Besken K, Oberdorfer C, MacKenzie CR, Takikawa O, Daubener W: Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. J Virol 2004;78:2632-2636.

7 Mao R, Zhang J, Jiang D, Cai D, Levy JM, Cuconati A, Block TM, Guo JT, Guo H: Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells. J Virol 2010;85:1048-1057.

8 Yeung AW, Wu W, Freewan M, Stocker R, King NJ, Thomas SR: Flavivirus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocyte-derived macrophages via tumor necrosis factor and NF-kappa b. J Leuk Biol 2012;91:657-666.

9 Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM: The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: Focus on hematology. Blood 2009;113:2394-2401.

10 Barth H, Raghuraman S: Persistent infection diseases say - IDO. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in disease pathogenesis and implications for therapy. Crit Rev Microbiol 2014;40:360-368.

11 Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, Shearer GM: HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. Blood 2007;109:3351-3359.

12 Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, Shearer GM, Andersson J, Chougnet C: HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. Blood 2006;108:3808-3817.

13 Cozzi A, Zignego AL, Carpendo R, Biagiotti T, Aldinucci A, Monti M, Giannini C, Rosselli M, Laffi G, Moroni F: Low serum tryptophan levels, reduced macrophage IDO activity and high frequency of psychopathology in HCV patients. J Viral Hepat 2006;13:402-408.

14 Larrea E, Riezu-Boj JI, Gil-Guerrero L, Casares N, Aldabe R, Sarobe P, Civeira MP, Heeney JL, Rollier C, Verstrepen B, Wakita T, Borras-Cuesta F, Lasarte JJ, Prieto J: Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. J Virol 2007;81:3662-3666.

15 Zignego AL, Cozzi A, Carpenedo R, Giannini C, Rosselli M, Biagioli T, Aldinucci A, Laffi G, Moroni F: HCV patients, psychopathology and tryptophan metabolism: Analysis of the effects of pegylated interferon plus ribavirin treatment. Dig Liver Dis 2007;39 Suppl 1:S107-111.

16 Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Mita E, Imai Y, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T: Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. J Gastroenterol 2013;48:660-670.

17 Rollier CS, Paranhos-Baccala G, Verschoor EJ, Verstrepen BE, Drexhage JA, Fagrouch Z, Berland JL, Komurian-Pradel F, Duverger B, Himoudi N, Staib C, Meyr M, Whelan M, Whelan JA, Adams VC, Larrea E, Riezu JI, Lasarte JJ, Bartosch B, Cosset FL, Spaan WJ, Diepolder HM, Pape GR, Sutter G, Inchauspe G, Heeney JL: Vaccine-induced early control of hepatitis C virus infection in chimpanzees fails to impact on hepatic PD-1 and chronicity. Hepatology 2007;45:602-613.

18 Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV: Robust hepatitis C virus infection in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:9294-9299.

19 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL: Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. J Exp Med 2003;197:633-642.

20 Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nat Med 2005;11:791-796.

21 Lambotin M, Baumert TF, Barth H: Distinct intracellular trafficking of hepatitis C virus in myeloid and plasmacytoid dendritic cells. J Virol 2010;84:8964-8969.

22 Thomas SR, Terentis AC, Cai H, Takikawa O, Levina A, Lay PA, Freewan M, Stocker R: Post-translational regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide. J Biol Chem 2007;282:23778-23787.

23 Laich A, Neurauter G, Widner B, Fuchs D: More rapid method for simultaneous measurement of tryptophan and kynurenine by HPLC. Clin Chem 2002;48:579-581.

24 Braun D, Longman RS, Albert ML: A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. Blood 2005;106:2375-2381.

25 Li Q, Pene V, Krishnamurthy S, Cha H, Liang TJ: Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving ikk-alpha in lipogenesis and viral assembly. Nat Med 2013;19:722-729.

26 Li Q, Brass AL, Ng A, Hu Z, Xavier RJ, Liang TJ, Elledge SJ: A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:16410-16415.

27 Thomas E, Gonzalez VD, Li Q, Modi AA, Chen W, Noureddin M, Rotman Y, Liang TJ: HCV infection induces a unique hepatic innate immune response associated with robust production of type III interferons. Gastroenterology 2012;142:978-988.

28 Metz P, Dazert E, Ruggieri A, Mazur J, Kaderali L, Kaul A, Zeuge U, Windisch MP, Trippler M, Lohmann V, Binder M, Frese M, Bartenschlager R: Identification of type I and type II interferon-induced effectors controlling hepatitis C virus replication. Hepatology 2012;56:2082-2093.

29 Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jermiin LS, Hunt NH: Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. Gene 2007;396:203-213.

30 Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatziioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM: Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature 2007;446:801-805.

31 Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM: The growing family of interferon regulatory factors. Cytokine & Growth Factor Reviews 1998;8:293-312.

32 Jeong YI, Kim SW, Jung ID, Lee JS, Chang JH, Lee CM, Chun SH, Yoon MS, Kim GT, Ryu SW, Kim JS, Shin YK, Lee WS, Shin HK, Lee JD, Park YM: Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the janus-activated kinase-protein

kinase cdelta-stat1 signaling pathway in interferon-gamma-stimulated murine dendritic cells. J Biol Chem 2009;284:3700-3708.

33 Lindenbach BD, Rice CM: The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. Nat Rev Microbiol 2013;11:688-700.

34 Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM: A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. Nature 2011;472:481-485.

35 Blackham S, Baillie A, Al-Hababi F, Remlinger K, You S, Hamatake R, McGarvey MJ: Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus. J Virol 2010;84:5404-5414.

36 Abbate I, Romano M, Longo R, Cappiello G, Lo Iacono O, Di Marco V, Paparella C, Spano A, Capobianchi MR: Endogenous levels of mRNA for IFNs and IFN-related genes in hepatic biopsies of chronic HCV-infected and non-alcoholic steatohepatitis patients. J Med Virol 2003;70:581-587.

37 Kanazawa N, Kurosaki M, Sakamoto N, Enomoto N, Itsui Y, Yamashiro T, Tanabe Y, Maekawa S, Nakagawa M, Chen CH, Kakinuma S, Oshima S, Nakamura T, Kato T, Wakita T, Watanabe M: Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. J Virol 2004;78:9713-9720.

38 Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL: Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (stat1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. J Biol Chem 1996;271:17247-17252.

39 Bartenschlager R, Pietschmann T: Efficient hepatitis C virus cell culture systems: What a difference the host cell makes. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:9739-9740.

40 Ramsauer K, Farlik M, Zupkovitz G, Seiser C, Kroger A, Hauser H, Decker T: Distinct modes of action applied by transcription factors stat1 and irf1 to initiate transcription of the ifn-gamma-inducible gbp2 gene. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:2849-2854.

41 Burdeinick-Kerr R, Govindarajan D, Griffin DE: Noncytolytic clearance of sindbis virus infection from neurons by gamma interferon is dependent on jak/stat signaling. J Virol 2009;83:3429-3435.

42 Trilling M, Le VT, Rashidi-Alavijeh J, Katschinski B, Scheller J, Rose-John S, Androsiac GE, Jonjic S, Poli V, Pfeffer K, Hengel H: "Activated" Stat proteins: A paradoxical consequence of inhibited jak-stat signaling in cytomegalovirus-infected cells. J Immunol 2014;192:447-458.

43 Sohn SY, Hearing P: Adenovirus sequesters phosphorylated stat1 at viral replication centers and inhibits stat dephosphorylation. J Virol 2011;85:7555-7562.

44 Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P: The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. J Immunol 2006;176:6752-6761.

45 Forouhar F, Anderson JL, Mowat CG, Vorobiev SM, Hussain A, Abashidze M, Bruckmann C, Thackray SJ, Seetharaman J, Tucker T, Xiao R, Ma LC, Zhao L, Acton TB, Montelione GT, Chapman SK, Tong L: Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:473-478.

46 Schmidt SK, Müller A, Heseler K, Woite C, Spekker K, MacKenzie CR, Däubener W: Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. Eur J Immunol 2009;39:2755-2764.

47 Müller A, Heseler K, Schmidt SK, Spekker K, Mackenzie CR, Däubener W: The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. J Cell Mol Med 2009;13:1125-1135.

Figure legends

Fig. 1. Expression of IDO in PHH. (A) PHH from two donors (H1421, H1423) were incubated with different doses of IFNs. IDO expression is shown as a ratio of IDO/GAPDH as compared with non-stimulated PHH. (B) PHH were incubated with IFN-γ and harvested at the indicated time points. Levels of IDO protein expression in PHH lysates were determined by western blotting. β-actin levels are shown as a loading control. (C) PHH were stimulated with IFN-γ (100 IU/ml) for 48 hours in the presence and absence of 1-DL-MT (100 µM). Then, cells were cultured for 4h in HBSS buffer containing 100 µM tryptophan. Kynurenine accumulation was measured in cell-culture supernatants by HPLC. Data are given as mean kynurenine production ± SD from two independent experiments.

Fig. 2. HCV infection stimulates IDO expression in PHH. PHH (donor H0199) were infected with JFH1 for 3h, washed, and lysed at the time points indicated. HCV RNA levels were normalized to GAPDH mRNA levels. Results are presented as fold induction to 3 h post-infected PHH. Gene induction was measured by real-time RT-PCR analysis in PHH exposed to JFH1 or UV-infected JFH1. Gene induction of IDO, IDO2, CXCL10, IFN-α, IFN-β, IFN-λ, IRF1, STAT1, MDA5, PKR, Claudin-1 and are shown as fold change over uninfected PHH cultures.

Fig. 3. Ongoing HCV replication in Huh7.5.1 cells enhances IFN-γ-induced IDO expression. (A) Robust HCV infection of Huh7.5.1 cells was determined using anti-HCV core staining and flow cytometry at day 5 post-inoculation. (B) JFH1-infected Huh7.5.1 cells and uninfected, control cells were stimulated with IFN-γ and then analyzed for IDO gene expression. (C) After 4h of IFN-γ stimulation, JFH1-infected Huh7.5.1 cells and control cells were analyzed for IFN-γ receptor chain α expression. (D) IDO gene expression levels in PHH

(donor H1421, H1423) and Huh7.5.1 cells in the presence or absence of IFN-γ. *P<0.05, **P<0.01

Fig. 4. IRF1 regulates IDO expression in HCV infection. (A) JFH1-infected Huh7.5.1 cells and uninfected, control cells were analyzed for IRF1 expression in the absence and presence of IFN-γ. IRF1 expression is shown as a ratio of IRF1/GAPDH. (B) IFN-γ induced IRF1 protein expression is shown as delta mean fluorescence intensity (ΔMFI, MFI of IFN-γ stimulated cells minus MFI of non-stimulated cells). (C) Huh7.5.1 cells were transfected with pcDNA IRF1 or pcDNA3.1. 48h post-transfection, IRF1 expression was verified by western blotting. IDO mRNA expression is shown in the presence or absence of IFN-γ in transfected cells. (D) IRF1 was silenced in Huh7.5.1 cells. Numbers represent densitometric analysis of IRF1 bands protein normalized to β-actin levels. Then, cells were stimulated with IFN-γ (50 IU/ml) for 7h and the relative levels of IRF1 and IDO mRNA expression determined. Data are expressed as the percentage of gene expression for IRF1 silenced Huh7.5.1 cells in comparison to si Control (=100%). (E) JFH1-infected Huh7.5.1 cells and control cells were analyzed for STAT1 expression in the absence and presence of IFN-γ. STAT1 expression is shown as a ratio of STAT1/GAPDH. (F) After treatment with IFN-γ, cells were harvested at the indicated times. Equal amounts of total cell lysates were immunoblotted with anti-STAT1 and anti-phospho-STAT1 antibodies. Densitometry analysis shows phospho-STAT1 levels relative to STAT1 levels. $*P<0.05$, $**P<0.01$.

Fig. 5. Impact of hepatic IDO expression on HCV infection. (A) Huh7.5.1 cells and PHH (H0204, H0216, H0208) were transfected with pcDNA IDO or pcDNA3.1. IDO protein expression was verified by western blotting. Functional activity of the expressed IDO protein in Huh7.5.1 cells was verified by accumulation of kynurenine in the supernatant in the presence and absence of the specific IDO inhibitor 1-DL-MT using the Ehrlich reagent method. (B) 48h post-transfection, Huh7.5.1 cells and PHH (donor H0204, H0216, H0208) were assessed for HCVpp entry (genotype 2a: JFH1, genotype 1b: HCV-J). Data are expressed as the percentage of HCVpp entry into IDO transfected PHH compared to pcDNA3.1-transfected control cells (=100%). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein

(VSVG)-pseudotyped virions were included as a control. (C) 48h post-transfection, Huh7.5.1 cells and PHH were incubated with JFH1 or HCV serum (genotype 1b). Two days after JFH1 infection, viral replication in IDO-transfected cells was measured. HCV RNA copies were normalized to GAPDH. Data are shown as mean % of HCV replication compared to pcDNA3.1-transfected cells (=100%). (D) Rescued HCV JFH1 replication in IDO-transfected Huh7.5.1 cells. JFH1 replication in IDO-transfected Huh7.5.1 cells was determined in the presence and absence of the specific IDO inhibitor 1-DL-MT. Data are shown as the mean ± SD of triplicate determinations and are representative of three independent experiments.

Fig. 6. IDO function as an ISG effector with anti-HCV activity. (A) Flowchart describing the three main parts of the experiment. Huh7.5.1 cells were transfected with siRNAs against the type I IFN receptor 2 (IFNαR2), IDO, or non-targeting control (NT) siRNAs. After 72 hours, cells were infected with HCV JFH1 virus and, after an additional 24 hours, IFN-α (10 IU/ml) was added. Twenty-four hours later, cells were harvested and HCV replication measured by qRT-PCR. (B) Knock-down efficiencies of IDO. IDO mRNA levels were quantified by qRT-PCR at day 5 after siRNA transfection. (C) Intracellular HCV RNA amounts. Data are shown as mean % of HCV replication compared to cells treated with NT siRNAs (=100%). Values represent the mean ± SD of triplicate measurements.

Fig. 7. Hepatic IDO expression inhibits CD4+ T cell proliferation. (A) Flow cytometry analysis of CD4 and CFSE staining following CD4+T/Huh7.5.1 cell co-culture. Huh7.5.1 cells were transfected with pcDNA IDO or pcDNA3.1. 48h post-transfection, cells were added to CD3/CD28 activated CD4+ T cells or control CD4+ T cells. CFSE fluorescence of undivided non-stimulated and CD3/CD28 activated CD4+ T cells undergoing multiple rounds of cell division following Huh7.5.1 co-culture is shown. (B) Pooled data from three different co-culture experiments are shown as mean proliferation index (PI) ± SD. Data were compiled

from three different healthy CD4+ T cell donors. Inhibition of CD4+ T cell proliferation by IDO-transfected Huh7.5.1 cells was statistically significant (**P<0.01). The presence of 1-DL-MT (1000 μM) for the duration of the co-culture partially restored IDO-mediated CD4+ T cell suppression.

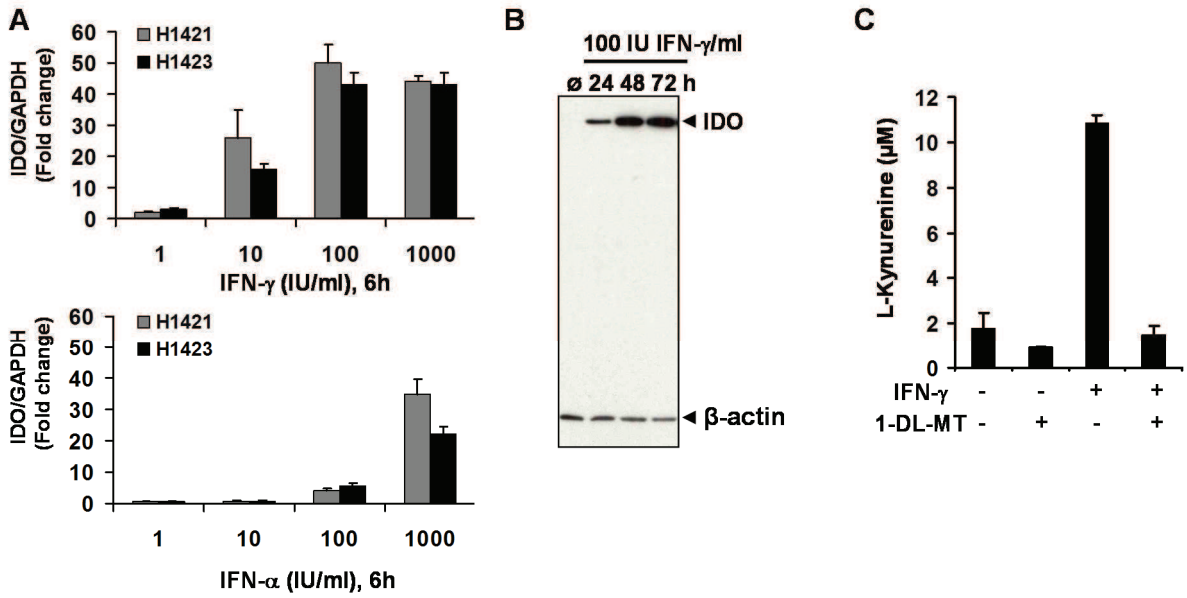

A
IDO/GAPDH (Fold change)
H1421
H1423
IFN-γ (IU/ml), 6h
IFN-α (IU/ml), 6h
B
100 IU IFN-γ/ml
ø 24 48 72 h
IDO
β-actin
C
L-Kynurenine (μM)
IFN-γ
1-DL-MT

Figure 1

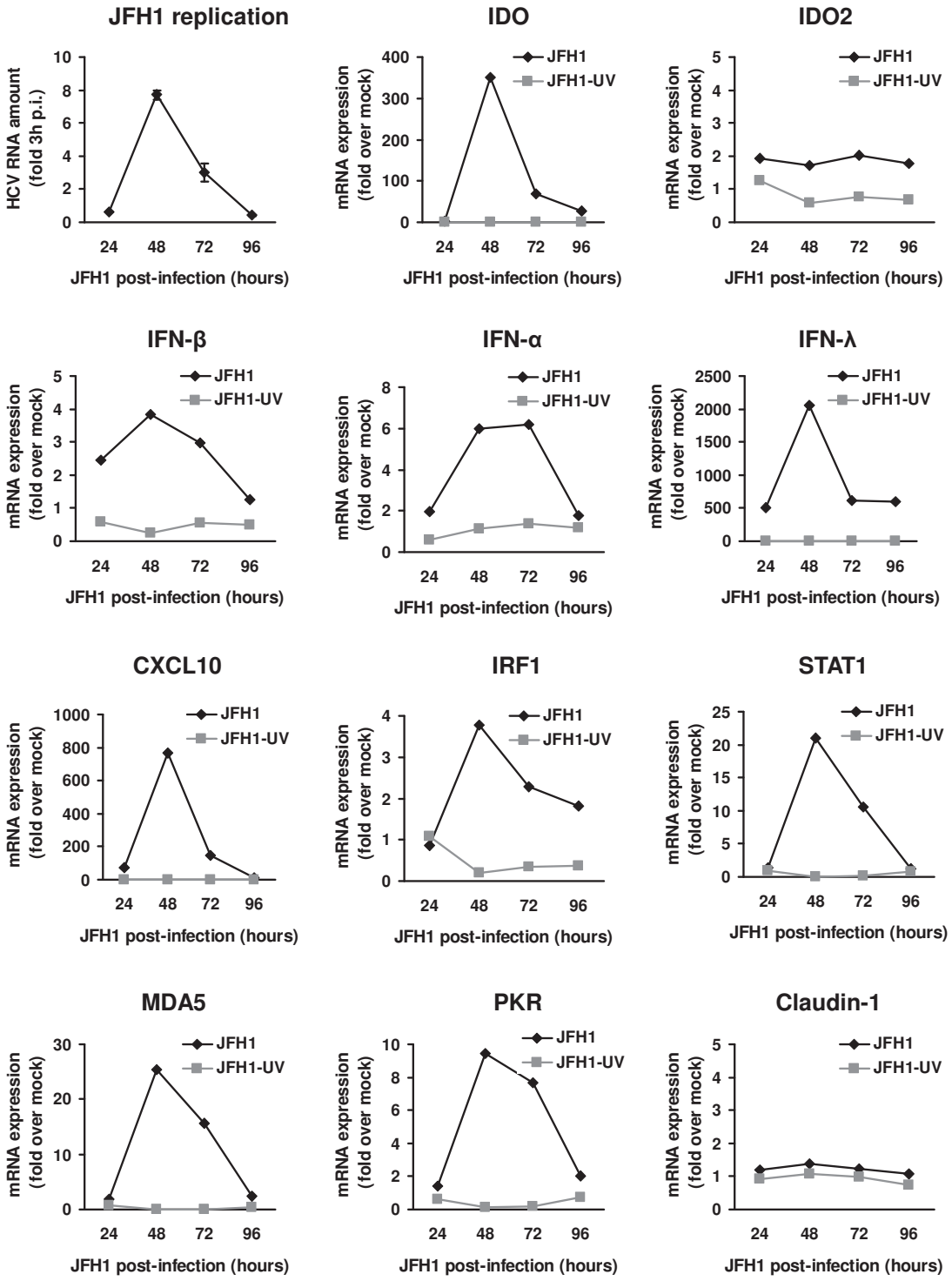

JFH1 replication
HCV RNA amount (fold 3h p.i.)
JFH1 post-infection (hours)
IDO
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
IDO2
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
IFN-β
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
IFN-α
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
IFN-λ
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
CXCL10
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
IRF1
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
STAT1
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
MDA5
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
PKR
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)
Claudin-1
mRNA expression (fold over mock)
JFH1
JFH1-UV
JFH1 post-infection (hours)

Figure 2

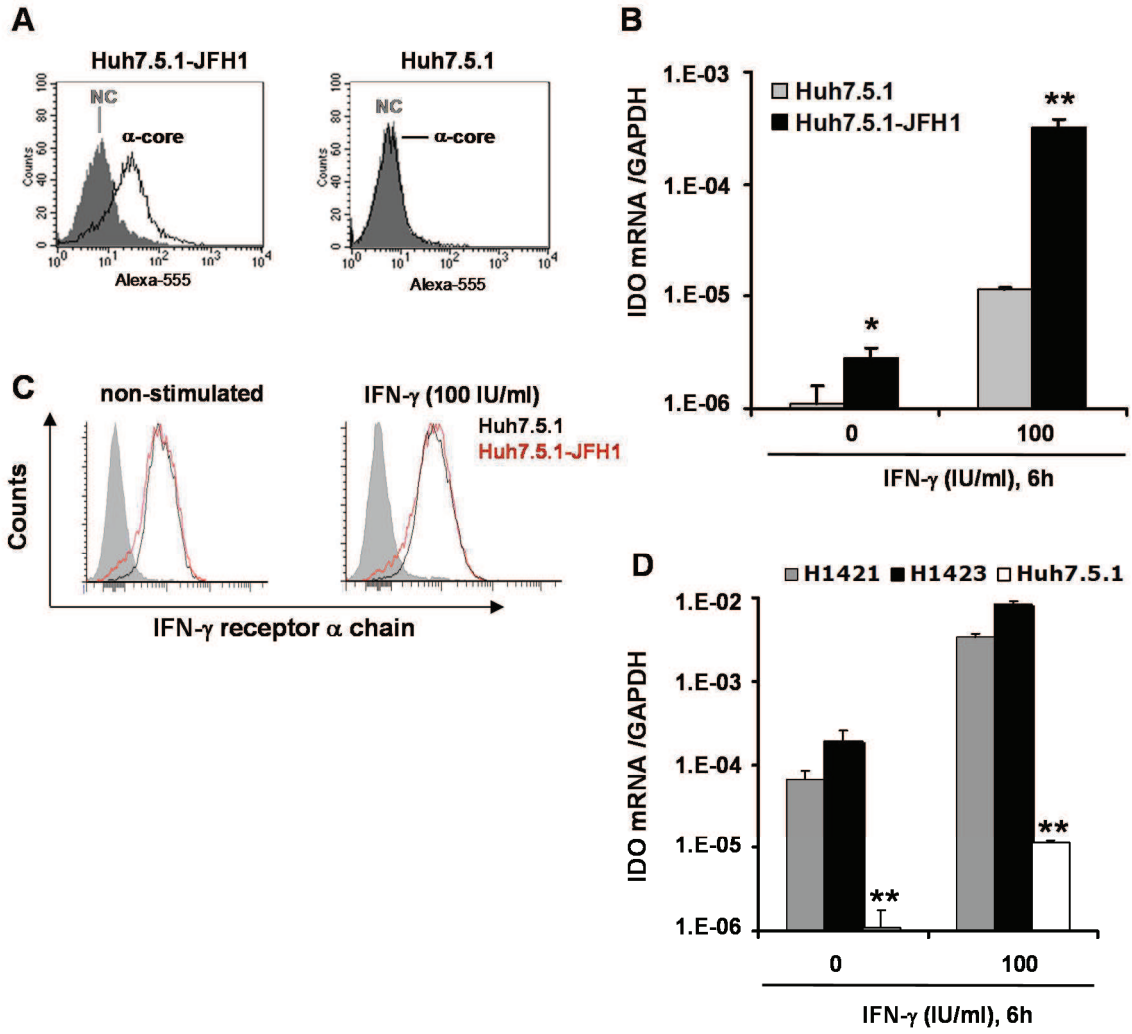

A
Huh7.5.1-JFH1
Huh7.5.1
NC
α-core
Counts
Alexa-555
B
IDO mRNA /GAPDH
Huh7.5.1
Huh7.5.1-JFH1
1.E-03
1.E-04
1.E-05
1.E-06
*
**
0
100
IFN-γ (IU/ml), 6h
C
non-stimulated
IFN-γ (100 IU/ml)
Huh7.5.1
Huh7.5.1-JFH1
Counts
IFN-γ receptor α chain
D
H1421
H1423
Huh7.5.1
1.E-02
1.E-03
1.E-04
1.E-05
1.E-06
**
**
0
100
IFN-γ (IU/ml), 6h

Figure 3

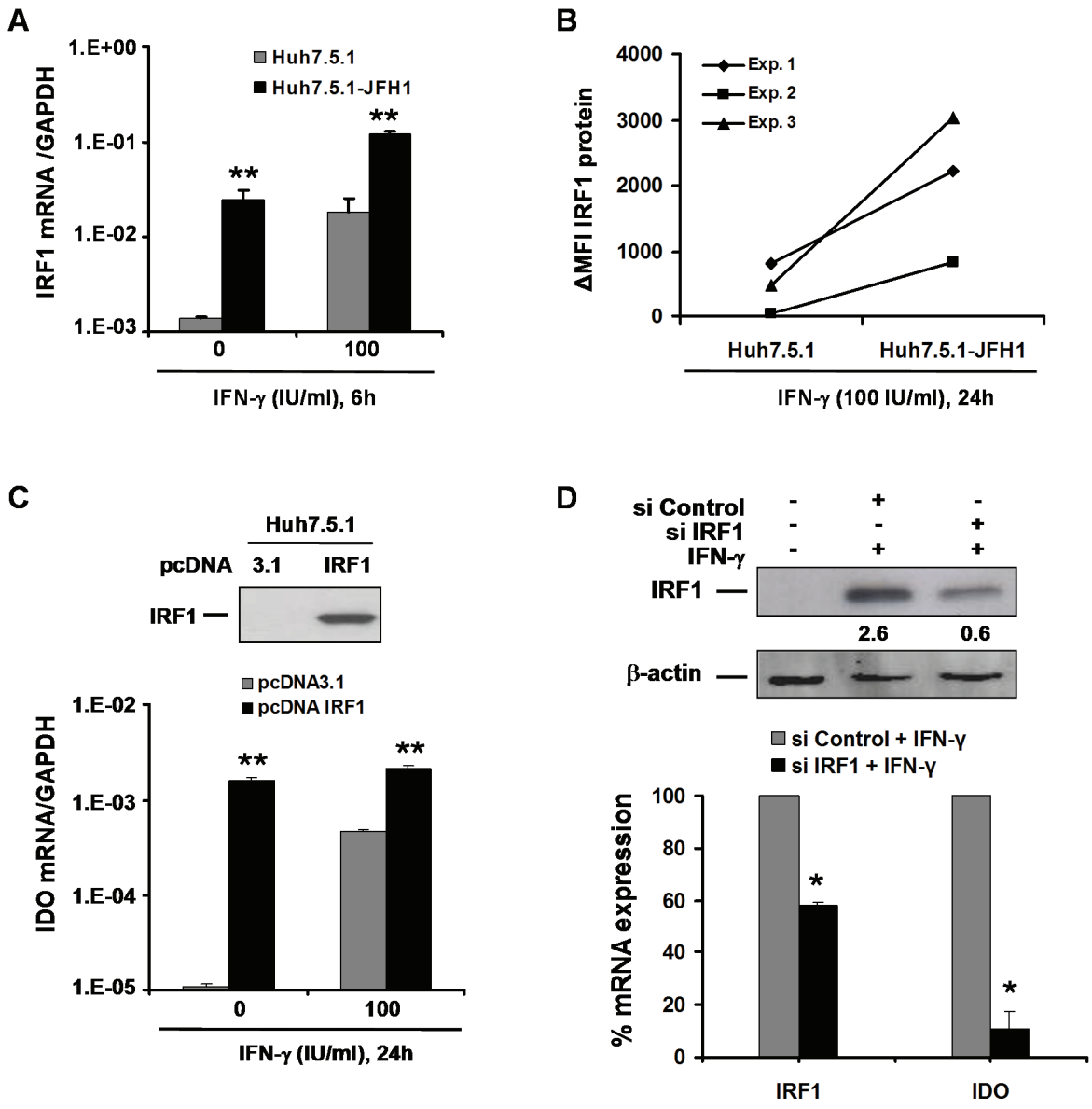

A
1.E+00
1.E-01
1.E-02
1.E-03
IRF1 mRNA /GAPDH
Huh7.5.1
Huh7.5.1-JFH1
**
**
0
100
IFN-γ (IU/ml), 6h
B
4000
3000
2000
1000
0
ΔMFI IRF1 protein
Exp. 1
Exp. 2
Exp. 3
Huh7.5.1
Huh7.5.1-JFH1
IFN-γ (100 IU/ml), 24h
C
Huh7.5.1
pcDNA 3.1 IRF1
IRF1
pcDNA3.1
pcDNA IRF1
1.E-02
1.E-03
1.E-04
1.E-05
IDO mRNA/GAPDH
**
**
0
100
IFN-γ (IU/ml), 24h
D
si Control
si IRF1
IFN-γ
IRF1
2.6
0.6
β-actin
si Control + IFN-γ
si IRF1 + IFN-γ
100
80
60
40
20
0
% mRNA expression
*
*
IRF1
IDO

Figure 4. a-d

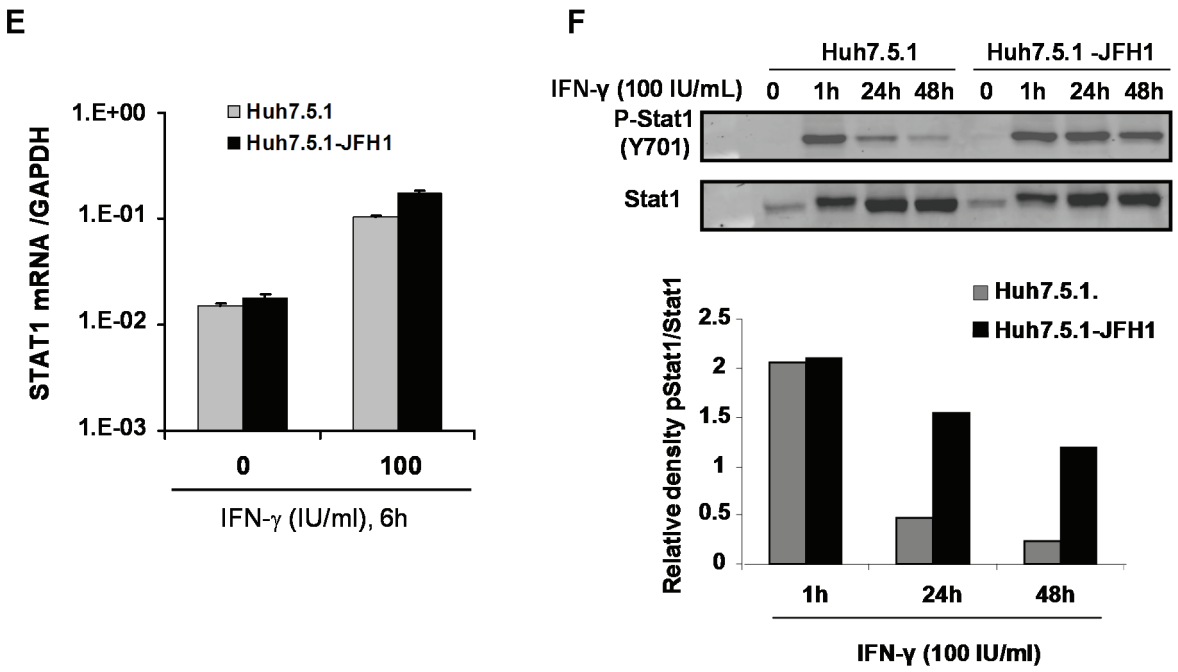

E
1.E+00
1.E-01
1.E-02
1.E-03
STAT1 mRNA /GAPDH
Huh7.5.1
Huh7.5.1-JFH1
0
100
IFN-γ (IU/ml), 6h
F
Huh7.5.1
Huh7.5.1 -JFH1
IFN-γ (100 IU/mL)
0 1h 24h 48h 0 1h 24h 48h
P-Stat1
(Y701)
Stat1
Huh7.5.1.
Huh7.5.1-JFH1
Relative density pStat1/Stat1
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1h
24h
48h
IFN-γ (100 IU/ml)

Figure 4. e-f

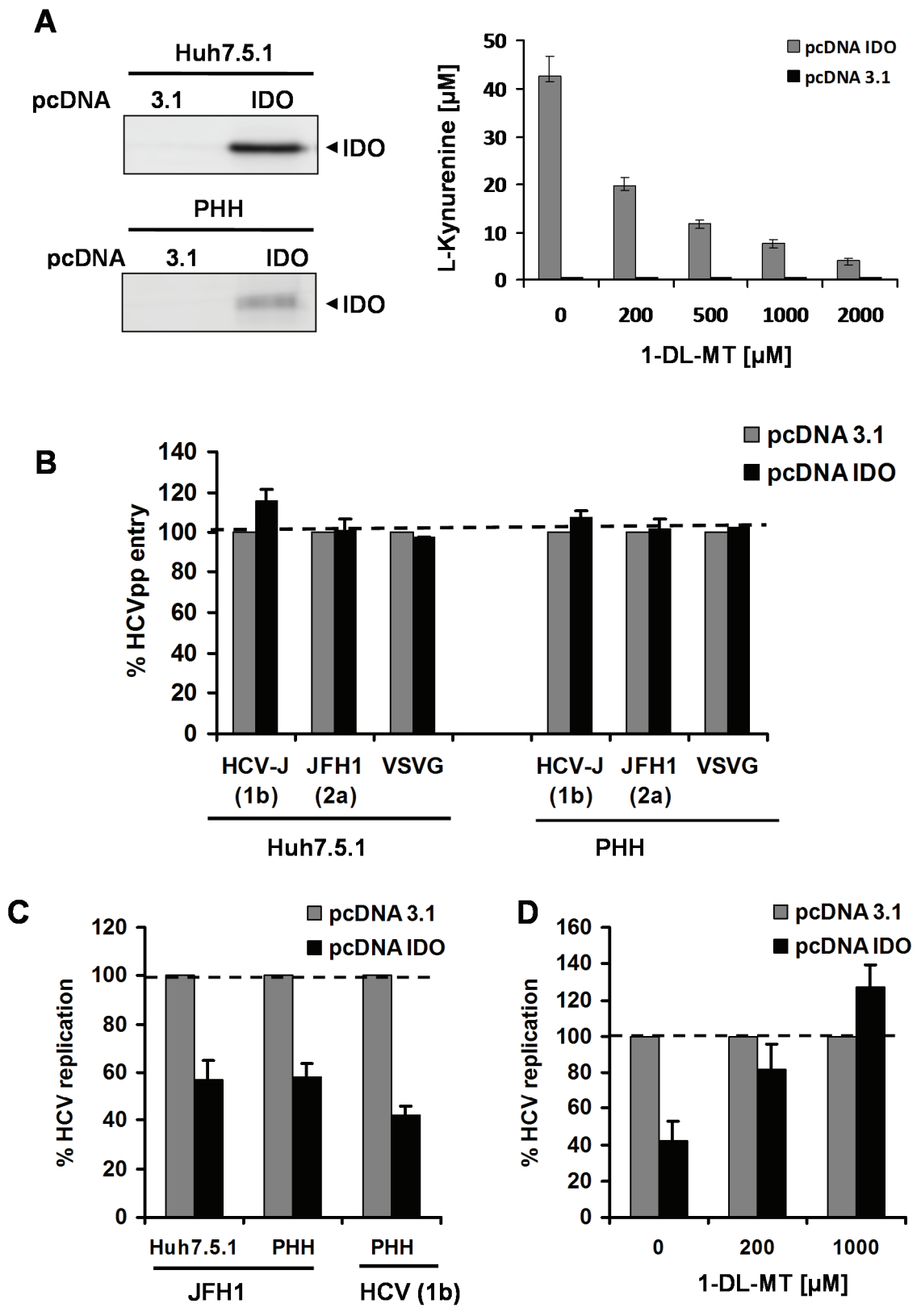

A
Huh7.5.1
pcDNA
3.1
IDO
IDO
PHH
pcDNA
3.1
IDO
IDO
L-Kynurenine [µM]
pcDNA IDO
pcDNA 3.1
1-DL-MT [µM]
B
pcDNA 3.1
pcDNA IDO
% HCVpp entry
HCV-J (1b)
JFH1 (2a)
VSVG
HCV-J (1b)
JFH1 (2a)
VSVG
Huh7.5.1
PHH
C
pcDNA 3.1
pcDNA IDO
% HCV replication
Huh7.5.1
PHH
PHH
JFH1
HCV (1b)
D
pcDNA 3.1
pcDNA IDO
% HCV replication
1-DL-MT [µM]

Figure 5

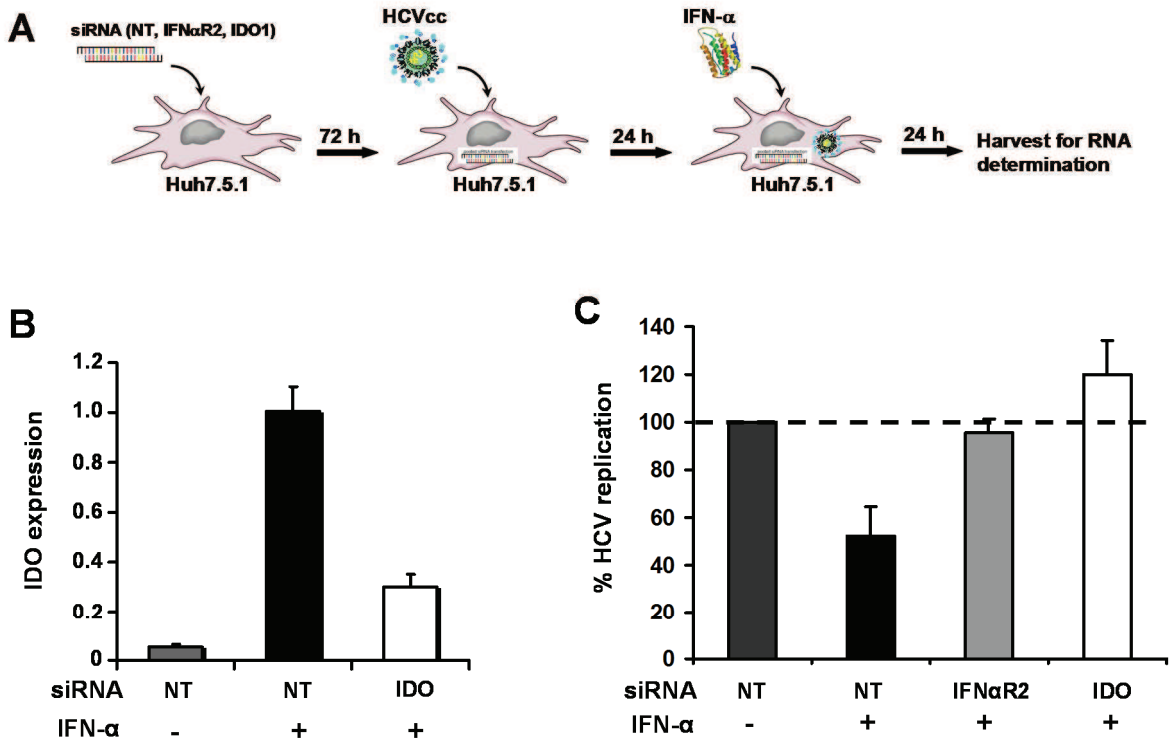

A
siRNA (NT, IFNαR2, IDO1)
HCVcc
IFN-α
Huh7.5.1
72 h
Huh7.5.1
24 h
Huh7.5.1
24 h
Harvest for RNA determination
B
IDO expression
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
siRNA NT NT IDO
IFN-α - + +
C
% HCV replication
140
120
100
80
60
40
20
0
siRNA NT NT IFNαR2 IDO
IFN-α - + + +

Figure 6

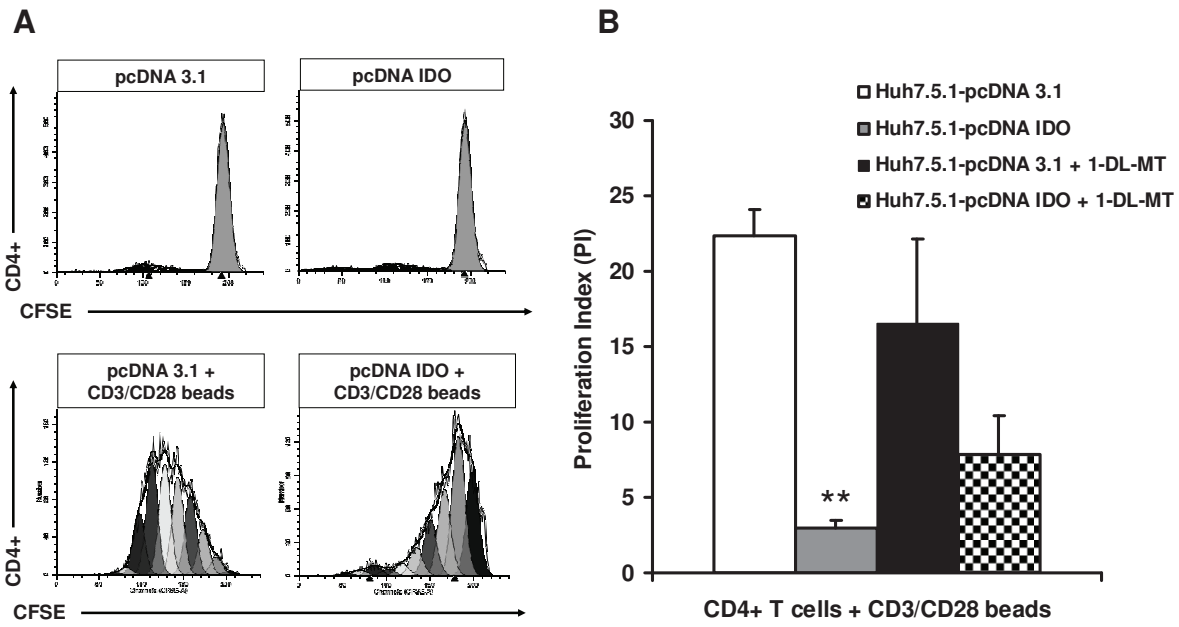

A
pcDNA 3.1
pcDNA IDO
CD4+
CFSE
pcDNA 3.1 +
CD3/CD28 beads
pcDNA IDO +
CD3/CD28 beads
CD4+
CFSE
B
Huh7.5.1-pcDNA 3.1
Huh7.5.1-pcDNA IDO
Huh7.5.1-pcDNA 3.1 + 1-DL-MT
Huh7.5.1-pcDNA IDO + 1-DL-MT
Proliferation Index (PI)
30
25
20
15
10
5
0
**
CD4+ T cells + CD3/CD28 beads

Figure 7

Quentin LEPILLER

Rôle de l'indoléamine-2,3-dioxygénase dans la persistance des infections virales

Résumé

L'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO) est une enzyme du catabolisme du tryptophane suspectée de jouer un double rôle lors des infections en contribuant aux défenses innées de l'hôte et en régulant la réponse immunitaire. IDO est exprimée au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC). Cependant, les mécanismes moléculaires conduisant à l'expression de IDO lors de l'hépatite C et l'impact de IDO sur la réplication virale et sur la réponse immunitaire ne sont pas connus. Dans ce travail de thèse, nous avons montré que le VHC stimule l'expression de IDO dans les hépatocytes. L'expression de IDO était transitoire et coïncidait avec l'expression des interférons (IFNs) de types I et III et avec la transcription de gènes stimulés par les IFNs. L'expression de IDO était également augmentée dans les hépatocytes exposés à la présence de lymphocytes T $CD4^+$ activés et producteurs d'IFN-γ. L'expression hépatique de IDO diminuait la réplication virale, ce qui suggère que IDO limite la diffusion du VHC dans le foie au cours de l'hépatite C. Grâce à des expériences de *silencing*, nous avons montré que IDO contribue à l'effet antiviral de l'IFN-α sur le VHC. L'expression de IDO était régulée par l'activation des facteurs de transcription IRF-1 et STAT-1 dans les hépatocytes infectés par le VHC. En plus de son effet antiviral sur le VHC, l'expression hépatique de IDO inhibait significativement la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ activés, suggérant un rôle immunorégulateur de IDO au cours de l'hépatite C. Nos données suggèrent donc que IDO joue un double jeu lors de l'hépatite C, en limitant la réplication virale et en régulant la réponse immunitaire adaptative de l'hôte. Notre travail ouvre la voie à des expérimentations *in vivo* et à des études cliniques visant à préciser la place des inhibiteurs pharmacologiques de IDO dans l'arsenal thérapeutique contre le VHC.

Mots clés : indoléamine-2,3-dioxygénase, VHC, immunité innée, tolérance immunitaire

Abstract

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) is a tryptophan-catabolizing enzyme that plays a dual role during infectious diseases by contributing to the innate defenses against pathogens and by regulating the immune response. IDO is expressed in patients with hepatitis C virus (HCV) infection. However, the molecular mechanism of IDO induction in HCV infection and its role in the antiviral immune response remain unknown. Using primary human hepatocytes, we have shown that HCV infection stimulates IDO expression. IDO gene induction was transient and coincided with the expression of type I and type III interferons (IFNs) and IFN-stimulated genes (ISGs) in HCV-infected hepatocytes. IDO expression was also stimulated when the hepatocytes were incubated with IFN-γ-secreting CD4+ T cells. Expression of IDO prior to HCV infection significantly impaired HCV replication in hepatocytes, suggesting that IDO limits the spread of HCV in the liver. By using siRNA-mediated IDO knockdown experiments, we have shown that IDO contributes to the IFN-α-antiviral effect on HCV replication. IDO expression was regulated by IRF-1 and STAT-1 in HCV-infected hepatocytes. Hepatic IDO expression also had a significant inhibitory effect on CD4+ T cell proliferation, suggesting an immunoregulatory role of IDO during HCV infection. Our data suggest that hepatic IDO plays a dual role during HCV infection by retarding viral replication and also regulating host immune responses. This work paves the way for *in vivo* experiments and clinical studies aiming to determine the relevance of pharmacological inhibition of IDO during HCV infection.

Key words : indoleamine-2,3-dioxygenase, HCV, innate immunity, immune tolerance