



HAL
open science

auto-immunité associée au virus de l'hépatite C: mise en évidence et caractérisation moléculaire d'antigènes cibles

Laurence Claveyrolas-Bouillet

► To cite this version:

Laurence Claveyrolas-Bouillet. auto-immunité associée au virus de l'hépatite C: mise en évidence et caractérisation moléculaire d'antigènes cibles. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00085002

HAL Id: tel-00085002

<https://theses.hal.science/tel-00085002>

Submitted on 11 Jul 2006

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

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

Université Joseph Fourier
Ecole doctorale de chimie et sciences du vivant

Doctorat de biologie cellulaire

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Laurence Claveyrolas-Bouillet

Auto-immunité associée au virus de l'hépatite C : mise en évidence et caractérisation moléculaires d'antigènes cibles

Soutenue le 6 juillet 2006, devant la commission d'examen

Monsieur Jean-Pierre Zarski	Président
Monsieur Patrice Cacoub	Rapporteur
Monsieur Didier Marguet	Rapporteur
Monsieur Jean-François Nicolas	Examineur
Monsieur Christian Drouet	Examineur

Thèse préparée au Laboratoire Transmission et Pathogénèse des Maladies à Prions
CNRS FRE2685 - Domaine de la Merci F-38706 La Tronche

Remerciements :

Je tiens tout d'abord remercier mon directeur de thèse **Christian Drouet** pour avoir accepté de diriger ce travail, pour tout son soutien, sa disponibilité et sa gentillesse tout au long des ces années ; nous avons eu une collaboration fructueuse qui j'espère continuera.

Je tiens tout particulièrement remercier **Bernabé Chumpitazi**, sans qui ce travail n'aurait pas pu être fait, pour avoir partagé ses compétences avec moi et m'avoir accompagné tout au long de ces années.

Merci aussi à **F. Csopaki** qui m'a aidée à faire mes premiers pas dans le laboratoire

Merci à **L. Grossi** pour son aide précieuse pour l'immunohistochimie des coupes de tissu

Merci à **N. Sturm** pour le temps qu'elle m'a consacré, de m'avoir obtenu des biopsies hépatiques et de m'avoir apporté son avis éclairé lors de la lecture des lames

Merci à **M-J Stasia** pour son accueil toujours très chaleureux dans le laboratoire d'Enzymologie, ainsi que mes remerciements au **Pr E. Borrel**

Merci à **B. Dublet** pour son accueil à l'IBS et sa disponibilité pour les mesures avec le MALDI ainsi qu'à **E. Forest**

Merci au **Pr P Miossec** pour m'avoir confié des échantillons des patients

Merci à **L. Kuhn** et à **J. Garin** pour leur disponibilité et d'avoir partagé leurs compétences dans ce domaine difficile qu'est l'analyse protéique

Je remercie **Kevin et Sébastien** qui ont été des artisans précieux de ce travail.

Je remercie le **Pr J-Y Cesbron** de m'avoir accueilli dans son laboratoire et mis tous les moyens pour la finalisation de ce travail

Je tiens à remercier mes maîtres, les Pr **C. Massot et J-L. Debru** pour m'avoir permis de mener à bien ce travail.

Je remercie le **Pr J-P. Zarski** de m'avoir permis d'accéder à son registre de patients, pour ses conseils éclairés et d'avoir accepté la position de président de jury d'examen

Je remercie le **Pr P. Cacoub** d'avoir accepté de participer à ce jury d'examen et de donner son avis spécialisé sur ce travail

Je remercie le **Pr J-F. Nicolas** pour avoir accepté d'être membre de ce jury d'examen malgré un emploi du temps très chargé

Je remercie le **Dr D. Marguet** pour avoir accepté d'analyser ce travail.

Enfin, je tiens à remercier toute ma **famille** pour son soutien tout au long de ce travail et plus particulièrement **mon père** pour son aide dans la rédaction

<u>Plan</u>	Page
<u>Introduction</u>	1
1. L'hépatite virale C	1
1.1 Expression virale pathologique	1
1.2 Virus de l'hépatite C	1
1.3 Réponse immunitaire anti-VHC et échappement du virus	4
1.4 VHC et auto-immunité	6
2. Protéines de stress ou HSP	8
2.1 Rôle dans l'immunité innée	8
2.2 Rôle dans l'immunité spécifique	9
2.3 Les complexes HSP-peptides	10
2.4 L'HSP70	11
3. Objectifs de ce travail	13
<u>Matériels</u>	14
1. Heat shock protéines	14
2. Protéines virales et leur anticorps	15
3. Autres protéines et leur anticorps	16
4. Patients	16
4.1 Patients VHC séropositifs sans manifestations extra-hépatiques	16
4.2 Patients VHC séropositifs avec des manifestations extra-hépatiques	17
4.3 Caractéristiques des populations VHC 1 et VHC AI	17
4.4 Patients lupiques	17
4.5 Témoins	17
5. Biopsies hépatiques	18
6. Souches cellulaires	18
6.1 Cellules HepG2NT	18
6.2 Cellules HepG2NT transfectées avec le minigène C1Inh	19
<u>Méthodes</u>	21
1. Immunohistochimie anti-HSP70 sur biopsies hépatiques	21
2. Production et purification de NS3 dans <i>E.coli</i>	21
3. Electrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS	22

4. Western Blot	22
5. Culture cellulaire	22
6. Préparation des lysats cellulaires	23
7. Evaluation du taux d'HSP dans les lysats	23
8. Dosage des anticorps anti-lysats	23
9. Evaluation du taux d'anticorps anti-HSP	23
10. Dosage de l'antigénémie HSP70	24
11. Purification et analyse des complexes HSP-peptides	24
11.1 Préparation des lysats	24
11.2 Chromatographie d'affinité par colonne ADP agarose	24
11.3 Chromatographie d'échanges d'ions HPLC	25
11.4 Dissociation des complexes HSP70-peptides	25
11.5 Séparation des peptides	25
11.6 Analyse par MALDI-TOF	25
11.7 Analyse par chromatographie couplée au spectre de masse	27
12. Activité protéolytique de NS3	27
12.1 Réaction entre C1Inh et NS3	27
12.2 Réaction entre NS3 et un substrat peptidique	27
12.3 Réaction entre le CYP 450 2D6 et NS3 RTS	28
13. Analyses statistiques	28
Résultats	29
1. Expression des protéines de stress dans l'infection par le VHC	29
1.1 Aspects immunohistochimiques des biopsies hépatiques	29
1.2 Détermination de l'antigénémie HSP70	31
1.3 Taux d'anticorps anti-HSP	32
2. Etude du stress cellulaire induit par le VHC	34
2.1 Mesure du taux de protéines chaperones dans les lysats	34
2.2 Evaluation de la réactivité des sérums vis-à-vis des lysats	35
2.3 Analyses de la réactivité des sérums des patients VHC 2	36
2.3.1 Développement d'anticorps anti-lysats	36
2.3.2 Corrélation entre le taux d'anticorps et les données de l'HCV	38
2.3.2.1 Corrélation avec le taux de TGO, l'âge, la virémie	38
2.3.2.2 Analyse du taux d'Ac en fonction de la réponse à l'IFN	40
2.4 Purification des complexes HSP70-peptides	41
2.4.1 Première étape de purification	42
2.4.2 Deuxième étape de purification	44
2.4.3 Rendement et coefficient de purification	46
2.5 Séparation des complexes HSP70-peptides	47

2.6 Identification des peptides associés à l'HSP70	48
2.6.1 Analyse par MALDI-TOF	50
2.6.2 Analyse du pool 3 par MALDI-TOF LV-MS/MS	52
2.6.3 Identification des peptides par séquençage	53
3. NS3 est capable de protéolyser des protéines de l'hôte	53
3.1 Interaction entre NS3 et C1Inh	53
3.1.1 Interaction extracellulaire	53
3.1.2 Interaction intracellulaire	56
3.1.3 Activité inhibitrice de C1Inh vis-à-vis de NS3	56
3.2 Interaction entre le CYP 450 2D6 et NS3	57
4. Conséquences de l'inhibition de NS3 sur le stress cellulaire	60
4.1 Diminution de la quantité d'HSP70 dans les lysats	60
4.2 Influence de NS3 sur la nature des peptides associés à HSP70	61
Discussion	62
1. Expression des HSP et des Ac chez les patients VHC	62
1.1 Surexpression d'HSP70 dans les tissus	63
1.2 Elévation de l'antigénémie HSP70	63
1.3 Présence et intérêts des Ac anti-HSP	64
2. Réactivité vis-à-vis du contenu protéique des cellules HepG2NT	65
2.1 Ac anti-lysats	65
2.2 Corrélation entre le taux d'Ac anti-lysats et la clinimétrie	66
2.3 Quels sont ces antigènes ?	66
3. Caractérisation des associations HSP70-peptides	68
4. Rôle de NS3 dans l'émergence de peptides antigéniques	72
5. Potentiel protéolytique de NS3 vis-à-vis es protéines de l'hôte	73
Conclusion et perspectives	75
Bibliographie	77
Abréviations	89
Annexes	91
1. Séquence peptidique de NS3	91
2. Séquence peptidique de C1Inh	92
3. Séquence peptidique de CYP 450 2D6	92
4. Listes des articles et posters issus de ce travail	93

Plan des tableaux :

1. Rôle des différentes protéines virales dans la résistance contre le système immunitaire	5
2. Répartition des HSP par famille	8
3. Caractéristiques des différentes HSP	11
4. HSP et leur anticorps	14
5. Protéines virales et leur anticorps	15
6. Autres protéines et leur anticorps	16
7. Caractéristiques des populations VHC 1 et VHC AI	17
8. Caractéristiques des différents groupes de patients	18
9. Caractéristiques des différentes souches cellulaires utilisées	20
10. Caractéristiques immunohistochimiques anti-HSP70 des biopsies hépatiques	30
11. Expression des Ac anti-HSP chez les différents groupes de patients	33
12. Tests de corrélation entre les Ac anti-lysats et les données clinimétriques du VHC	39
13. Répartition des patients répondeurs ou non en fonction des Ac anti-lysats	41
14. Intérêt prédictif des Ac anti-lysats vis-à-vis de la réponse à l'IFN	41
15. Tableau de purification des complexes	46
16. Peptides du pool 3 (MALDI-TOF)	50
17. Peptides analysés par MALDI-TOF LC-MS/MS	52
18. Cellules cibles des HSP	63
19. Comparaison des prévalences des Auto-Ac chez les patients VHC et VHC AI	64
20. Liste des protéines susceptibles d'être associées à HSP70	71

Plan des figures :

1. Protéines NS3 du VHC	2
2. Partie protéase de NS3	2
3. Polyprotéine du VHC et sites de coupure de NS3	3
4. Répartition des protéines virales dans le RE	3
5. Moyens utilisés par le VHC pour échapper aux défenses immunitaires	5
6. Hypothèses étiologiques de l'auto-immunité associée aux virus	7
7. Rôle des HSP dans la réponse immunitaire	9
8. Facteurs régulateurs de la synthèse d'HSP70	12
9. Différentes conformations d'HSP 70	12
10. Représentation de la polyprotéine virale et de NS3	16
11. Antigénémie HSP70 chez les différents groupes de patients	31
12. Ac anti-HSP70 chez les différents groupes de patients	32
13. Ac anti-HSP90 chez les différents groupes de patients	33
14. Ac anti-grp78 chez les patients VHC 1 répondeurs ou non à l'IFN	34
15. Taux de protéines chaperones dans les lysats cellulaires	35
16. Ac anti-lysats chez les différents groupes de patients	36
17. Ac anti-lysats HepG2 NT chez les patients VHC 2	37
18. Ac anti-lysats HepG2 chez les patients VHC 2	38
19. Corrélation entre le taux d'Ac anti-lysat et les TGO	39
20. Ac anti-lysats chez les patients VHC 2 répondeurs ou non à l'IFN	40
21. Première étape de purification des complexes HSP70-peptides	42
22. Profil d'élution des protéines après la colonne ADP agarose	43

23. Tests ELISA des fractions collectées après la colonne ADP agarose	43
24. Deuxième étape de purification des complexes	44
25. Tests ELISA des fractions collectées après l'HPLC	45
26. Gel SDS-PAGE du pool 1 post HPLC	45
27. Rendement de purification	47
28. Gel SDS-PAGE des complexes HSP 70-peptides avec ou sans ATP	48
29. Chromatographie des peptides libérés des complexes	49
30. Spectre du MALDI-TOF des peptides	51
31. Spectre du MALDI-TOF LC-MS/MS des peptides	52
32. Immunoblot de l'incubation de NS3 avec C1Inh	53
33. Immunoblot de l'incubation de NS3 avec C1Inh et des inhibiteurs de protéase	55
34. Immunoblot de l'incubation de NS3 avec C1Inh et l'hydroxylamine	55
35. Immunoprécipitation des lysats HepG2 Nt avec le minigène C1Inh	56
36. Activité protéolytique de NS3 en présence de C1Inh	57
37. Gel et Immunoblot de l'incubation de NS3 avec le CYP 450 2D6	58
38. Gel de l'incubation de NS3 avec le CYP 450 2D6 et BILN 2061	59
39. Taux d'HSP70 dans les lysats des cellules HepG2 NT cultivées avec BILN 2061	60
40. Rôle des protéines de stress dans la présentation de l'antigène Ro60	67
41. Rôle de l'HSP73 dans la pathogenèse de la PR	68
42. Profil du MALDI de peptides issus de cellules infectées par le VSV	70
43. Profil de l'HPLC des peptides issus de CHC associé au VHB	70

Plan des schémas :

1. Principe de la purification des complexes à partir de cellules HepG2 NT	11
2. Représentation de la partie N-terminale de la polyprotéine virale	19
3. Principe du MALDI	26

<u>Photo 1 :</u> Spectromètre de masse	25
---	----

Introduction

1. L'hépatite virale C

Le virus de l'hépatite C (VHC) est responsable de maladies chroniques du foie. Sa prévalence en France est de 1,1% soit 500 000 à 600 000 personnes touchées [1; 2]. Elle est de 3 à 4% en Europe et jusqu'à 10% dans certains pays africains (Gabon, Egypte). Ces chiffres sont probablement sous estimés car 80% des sujets infectés sont asymptomatiques et ne sont donc pas forcément dépistés. L'infection se caractérise par un taux élevé de passage à la forme chronique (80%) alors qu'il est bien plus faible pour le virus de l'hépatite B (5%). L'infection chronique par le VHC favorise la cirrhose (20-30% des cas) et le carcinome hépato cellulaire (30% après 10 ans d'évolution cirrhotique). Les modes de transmission sont encore mal connus : transfusion sanguine (risque résiduel actuellement de 1/700 000), toxicomanie intra veineuse, endoscopies, tatouages piercings... Mais il reste encore de nombreux cas où la transmission n'est pas connue. Le virus est présent dans la salive et le sang [3]. La transmission par voie sexuelle n'est pas évidente.

1.1 Expression virale pathologique

Suite au contact avec le VHC [1], la charge virale augmente rapidement pendant 15j (temps de doublement rapide de 1,7j) puis elle se ralentit pendant les 3 à 5 semaines suivantes (temps de doublement plus lent de 11,5j) avant d'atteindre un plateau ; la réponse immunitaire intervient alors et parallèlement à la baisse de la charge virale apparaît une élévation des transaminases et la séroconversion (anticorps dont les cibles sont les protéines immunodominantes : le core, NS3, NS4). Durant cette phase, seuls 10% des patients sont symptomatiques (hépatite aigüe). La guérison totale va survenir chez 20 à 30% des patients [4]. Le passage à la chronicité a donc lieu chez environ 80% des sujets infectés : 5% resteront porteurs sains mais 90% développeront une hépatite chronique dont l'histoire naturelle évoluera dans 10 à 20% des cas vers une cirrhose (sur 30 ans en moyenne), avec un développement possible en carcinome hépatocellulaire (CHC). Le doublement de la prévalence des carcinomes hépatocellulaires ces 20 dernières années est probablement lié à cette pandémie virale [1].

1.2 Virus de l'hépatite C

Le virus responsable de l'hépatite C a été identifié en 1989 par clonage de son génome [5] ; le virus n'a jamais été observé au microscope. Il s'agit d'un virus à ARN monocaténaire possédant une capsid (ou core) et une enveloppe, appartenant à la famille des flavivirus. L'ARN comprend 9600 nucléotides avec un cadre de lecture ouvert unique codant pour une polyprotéine de 3010 acides aminés. Situé en partie 5', l'IRES (internal ribosome entry site), partie non transcrite permet la lecture de l'ARN en se fixant aux ribosomes (figure 3). Cette polyprotéine code pour des protéines structurales du virus (capsid (C), enveloppe (E1,E2)) et non structurales (NS2, NS3, NS4, NS5) [6].

La protéine NS3 est une protéine hydrophile de 67 kDa [1]. La protéine NS3 supporte 2 activités **essentiels** à la réplication virale [7, 8] (fig 1) :

-Une activité ARN hélicase dans la partie C-terminale (NTPase/hélicase).

-Une activité **protéase à Sérine** (côté N-terminal) de type trypsine, portée par la triade His-Asp-Ser, qui s'exerce vis-à-vis de la partie non structurale virale (NS3-NS5B), en aval de NS3. La séquence substrat consensus est assez large: **D/EXXXXC/T↓A/S**, avec un résidu cystéine ou thréonine en P1 [6]. Ses substrats naturels viraux sont par ordre de coupure préférentielle (selon l'échelle des valeurs k_{cat}/K_m): NS3-NS4A (clivage

intramoléculaire), NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B (clivage intermoléculaire) (fig 2)

Ces 2 domaines sont associés ; il n'a jamais été montré une quelconque séparation par clivage protéolytique. Il semblerait même qu'il y ait une coopération fonctionnelle entre les 2 parties.

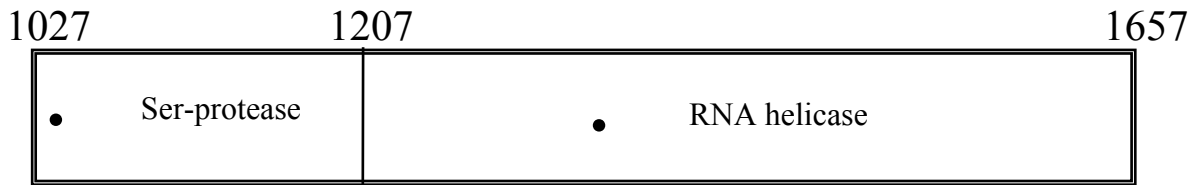


Fig 1 : Protéine non structurale NS3 du VHC

Le **peptide NS4A**, petite protéine transmembranaire de 54 AA (séquence 1658-1712), est un cofacteur essentiel de la protéase NS3. Il permet d'augmenter la $\frac{1}{2}$ vie (de 3 à 26 h) et l'activité protéolytique de NS3 (augmentation de 30 fois du rapport K_{cat}/K_m de la coupure de NS5) [9,10]. En formant un hétérodimère stable (nécessitant la présence de zinc en N-terminal), NS4A permettrait de stabiliser la partie N-terminale de NS3 (fig 2). De plus, NS4A permet l'ancrage de NS3 sur la membrane du réticulum endoplasmique [11] permettant à la protéase de rester à proximité de ses substrats (fig 4). L'analyse de la structure tridimensionnelle de NS3-NS4A montre un aspect proche de celui des chymotrypsines [12, 13].

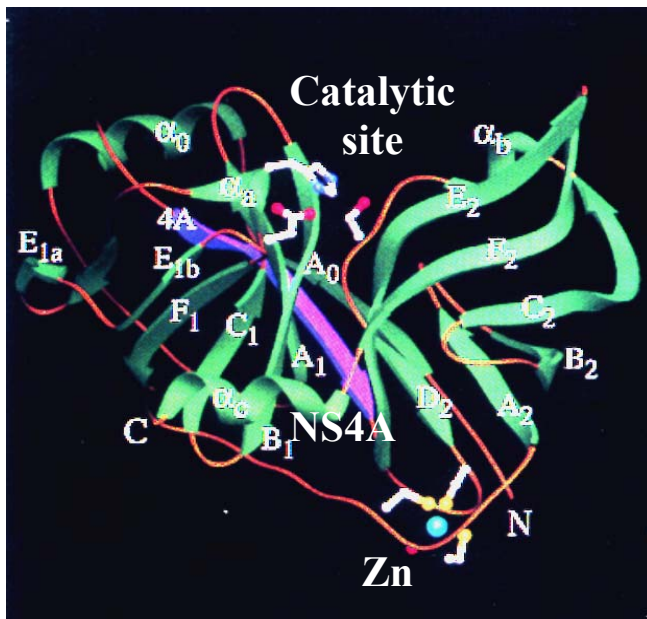


Fig 2: Partie protéase de NS3 avec son site catalytique, et ses sites de fixation avec NS4A et le zinc. [14]

Le clivage de la partie N-terminale de la polyprotéine produisant les protéines structurales, est réalisé par des signalases cellulaires dans le réticulum endoplasmique (RE). Les protéines non structurales sont produites par la coupure de la polyprotéine grâce aux 2 protéases virales NS2-NS3 et NS3 associée à son co-facteur (NS4A) (fig 3).

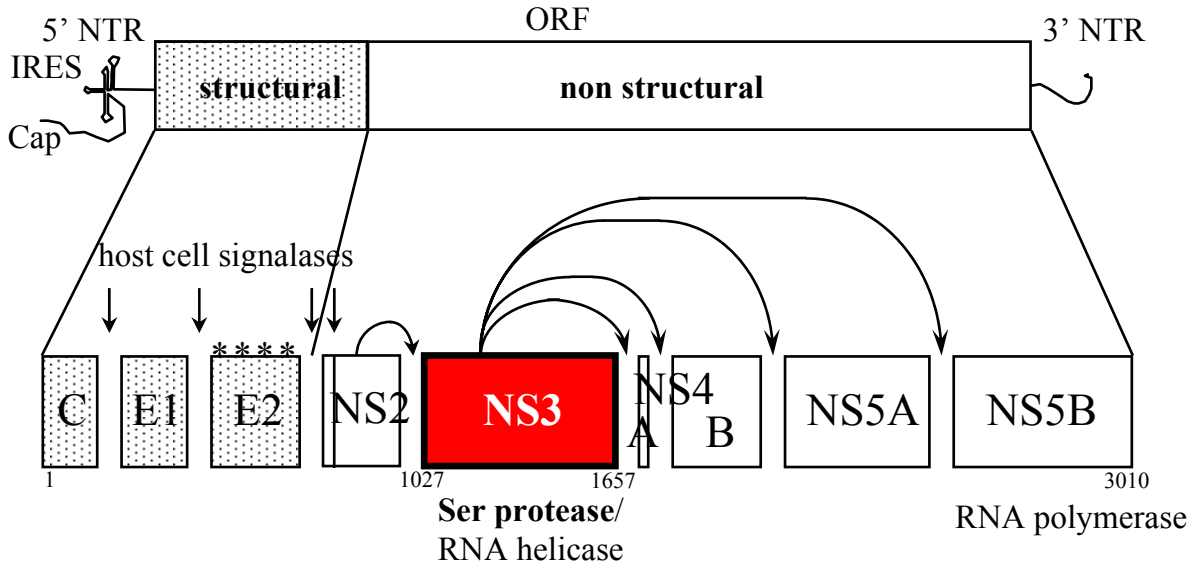


Fig 3 : Représentation de la polyprotéine du VHC et des sites de coupure de NS3 [6]

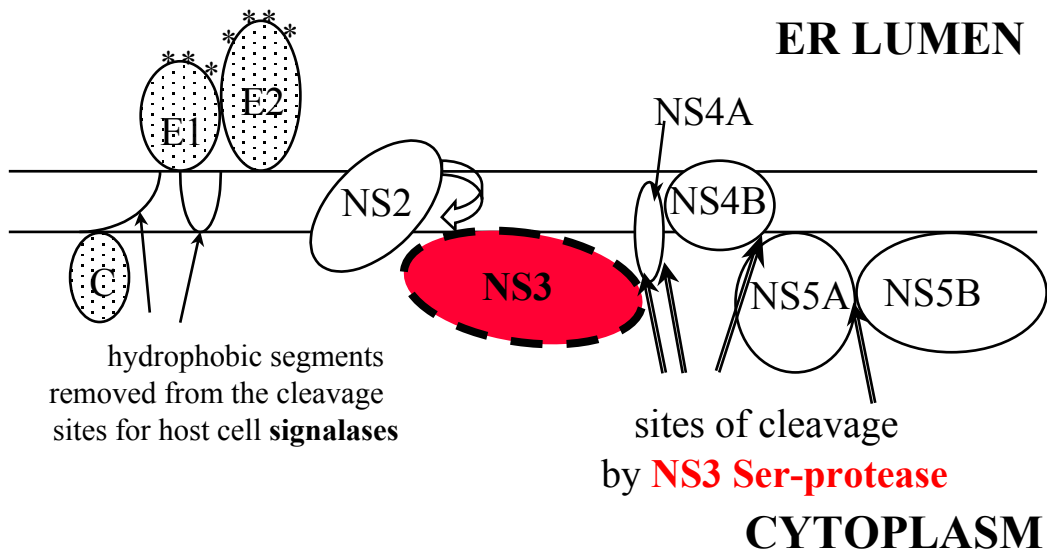


Fig 4 : Répartition des protéines virales dans le RE [15]

Les possibilités d'analyse de l'infection virale sont limitées : modèles animaux onéreux (chimpanzés ou souris chimériques SCID (severe combined immunodeficiency)) [16], absence de systèmes fiables de culture cellulaire du virus (notamment pour l'examen des caractéristiques infectieuses des virions produits). Dès 1999 sont apparus les systèmes cellulaires de répliques [17], et récemment l'utilisation de la souche JFH-1 (génotype 2a) a permis de créer un modèle d'infectivité virale avec production de virions infectieux [18].

1.3 Réponse immunitaire anti-VHC et échappement du virus

Le VHC présente 2 caractéristiques pouvant expliquer la persistance de l'infection : son taux de réplication élevée et sa grande variabilité génétique chez un même individu.

La réplication virale est très rapide : 10^{12} virions sont produits par jour. Cette réplication rapide favorise la génération de variants qui, sous la pression de sélection des réponses anti-virales de l'hôte, est responsable d'une distribution en quasi-espèces du virus et qui lui permet d'échapper au système immunitaire. Il existe 6 génotypes majeurs qui varient selon les pays (1, 2 et 3 en Europe, 4 en Egypte, 5 en Afrique du sud, 6 en Asie) et qui sont associés à des susceptibilités de réponse thérapeutiques différentes (combinaison Interféron-Ribavirine) : les meilleures réponses ayant lieu avec les génotypes 2 et 3. Il existe plus de 100 sous types [19].

Le foie est le site de réplication principal du virus (il peut cependant se répliquer dans les lymphocytes B et T et peut-être les cellules dendritiques). Le taux de protéines virales et d'ARN viral est très bas dans les tissus infectés (5-10% des hépatocytes). Ces cellules infectées permettent la genèse de nouveaux virions (50 particules virale par hépatocyte et par jour) mais finissent par mourir (1/2 vie des cellules infectées : 2à 70j) [1, 19]. L'internalisation cellulaire du virus se produit surtout grâce à la protéine E2 qui interagit avec des récepteurs cellulaires en cours d'identification, bien que la protéine CD81 et le récepteur au LDL soient considérés comme très probables récepteurs [16].

Il est certain que la seule réponse vraiment efficace pour l'éradication du virus est la réponse immunitaire cellulaire : la réponse T CD8 importante et soutenue avec production d'interféron est corrélée à l'éradication du virus; une forte réponse T CD4 (dirigée entre autre contre un épitope immunodominant de NS3) est corrélée à la clearance virale surtout si les cellules expriment un profil Th1 [20]. On assiste à une réponse spécifique des cellules T 10 à 30 fois plus importante dans le foie que dans le sang, mais ces lymphocytes ont un profil (CD38+) particulier qui favorise l'inflammation chronique sans éradication virale efficace [21]. Le VHC a la faculté d'échapper au système immunitaire par plusieurs voies. La réponse humorale bien que produisant des anticorps qui peuvent être neutralisant (en bloquant les protéines E1 et E2), n'est pas corrélée à l'évolution favorable clinique [20 ; 22]. Il échappe à la reconnaissance T du fait d'une réplication rapide qui submerge les cellules T CD8 produisant de l'IFN en quantité insuffisante au moment du pic virémique. Ce haut niveau de réplication favorisant les mutations, les épitopes changent et échappent à la reconnaissance immunitaire. Le virus est de plus très peu cytopathique, trop peu d'antigènes viraux sont libérés par les cellules infectées, avec peu d'endocytose par les cellules dendritiques [19, 23, 24].

Le virus développe une résistance à l'interféron, cytokine clé de la défense anti-virale. Plusieurs protéines virales interfèrent dans la voie de l'interféron (tableau 1) : NS3 bloque IRF3 (facteur de transcription de l'IFN), E2 et NS5 bloquent la protéine kinase R [21, 24]. Enfin, le virus détourne l'attaque du système immunitaire par plusieurs voies (fig 5). L'interaction entre E2 et CD81 inhibe les fonctions des cellules NK. Les protéines de l'enveloppe bloquent les fonctions et l'activation des cellules dendritiques. La protéine de la

capside intervient à plusieurs niveaux : elle induit l'apoptose des cellules T spécifiques en se liant à CD95 ; elle se lie à un récepteur pour le C1q (gC1qR) et inhibe la prolifération des LT, la production d'IL2 et d'IFN ; elle se lie au récepteur du TNF et le bloque [24].

Viral protein	Host target	Impact on immune response	Refs.
Core	gC1qR	Suppression of T cell activation and proliferation; possible role in inhibition of mφ	[19,22,30,61]
	TNFR1/Fas	Modulation of apoptosis in T cells and hepatocytes	[44,45]
	?	Impairment of DC function	[60]
E2	PKR	Inhibition of IFN-induced antiviral activity	[23,24]
	CD81	Inhibition of NK cell cytotoxicity and proinflammatory cytokine production	[31,32]
NS3/4A	DC-SIGN/DC-SIGNR	Impairment of DC function	[34,35]
	IRF-3	Suppression of antiviral interferon response	[29]
NS5A	PKR	Inhibition of IFN-induced antiviral activity	[25,26,28]

Tableau 1 : Rôle des différentes protéines virales dans la résistance contre le système immunitaire [24]

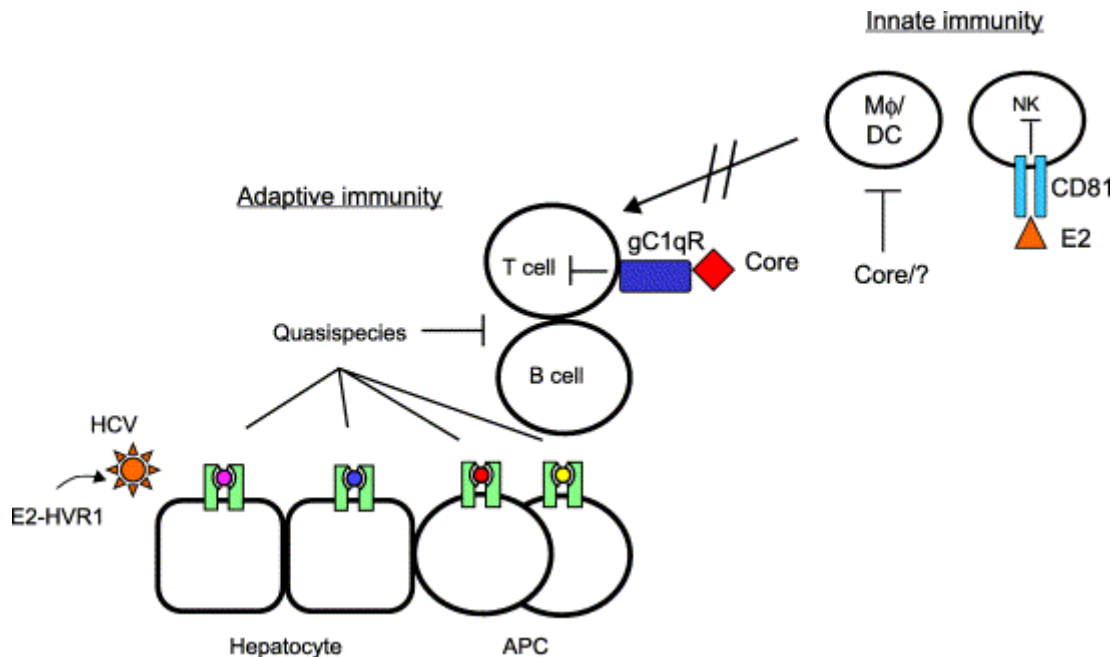


Fig 5 : Différents moyens qu'utilise le VHC pour échapper aux défenses immunitaires [24]

1.4 VHC et auto-immunité

Comme la plupart des autres virus à ARN, le VHC est particulièrement associé à des manifestations auto-immunes [25]. Cacoub et al [26] ont montré dans une série de 321 patients atteints d'hépatite C chronique que 70% expriment au moins un auto-anticorps (cryoglobuline, ACAN, FR...). Une manifestation extra hépatique apparaît dans 38% des cas (arthralgies, atteinte cutanée, sialadénite, neuropathie..). Bien que probablement surestimé par un biais de recrutement (patients issus essentiellement de services de médecine interne), il est noté que 14% des patients ont une maladie auto-immune identifiée (cryoglobulinémie mixte, syndrome de Sjögren, LEAD, pan artérite noueuse, polyarthrite rhumatoïde, hépatite auto-immune....).

Par quels mécanismes l'infection virale favorise-t-elle l'auto-immunité ? Les hypothèses sont multiples et ne s'excluent probablement pas les unes des autres.

L'auto-immunité associée à la cryoglobuline et au FR (fortement associée à une durée longue de l'infection) serait liée à 2 mécanismes [27] :

1. La production d'anticorps faiblement neutralisants aurait l'inconvénient de former des complexes immuns pathogènes. Il a été montré en effet la présence d'anticorps anti-VHC, et d'ARN viral dans la cryoprécipité, associé à des anticorps avec une activité de FR. Il y a 20 à 1000 fois plus d'anticorps et de particules virales dans le cryoprécipité que dans le sérum.
2. Le lymphotropisme B du VHC favorise sans doute une sélection monoclonale : il a été montré que 80% du composant monoclonal de ces cryoglobulines mixtes partagent le même idiotype qui aurait une homologie avec une séquence protéique de la capsid. La lymphoprolifération serait encouragée par l'interaction entre E2 et CD81. Il a été montré une augmentation du taux de LB CD5+ et de l'expression du CD81 chez les patients VHC par rapport aux témoins et à des patients infectés par le VHB. Cette augmentation est corrélée avec la production de facteur rhumatoïde et de cryoglobuline, ainsi qu'avec la charge virale et l'activité histologique [28]. Enfin, on note une surexpression de bcl-2 dans les LB chez les patients porteurs d'une infection chronique par le VHC associée à une cryoglobuline mixte (71-86% vs 16-37% chez les patients VHC positifs sans cryoglobuline).

Les autres cas de dysimmunité associés au VHC (ACAN, Ac anti-muscle lisse, anti-LKM1, anti-thyroidien...) sont plus mal compris. L'hypothèse la plus simple serait celle d'un mimétisme moléculaire entre des protéines virales et celles du soi [29, 30]. Ainsi il a été observé des reconnaissances croisées :

- Entre certains épitopes de la protéine nucléaire RNP (impliqué dans le LEAD) et une protéine de l'EBV
- Entre une protéine du coxsackivirus et la protéine GAD₆₅ (impliquée dans le diabète de type I).
- Il existe pour le VHC une homologie entre un épitope de E1 et une région immunodominante du cytochrome P450 2D6 (cible des anticorps anti-LKM1 impliqués dans l'hépatite auto-immune associée au VHC) [31, 32]. Il semblerait aussi que certaines cibles antigéniques des ACAN et des Ac anti-muscles lisses aient des homologies avec des séquences de NS3 [33].

Cette hypothèse séduisante n'explique pas à elle seule la rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes du soi et l'apparition d'une réaction humorale et cellulaire auto-immune forte et soutenue.

Le développement de super antigène pourrait expliquer cette rupture de tolérance puisque la restriction CMH est large, avec l'activation de très nombreux clones [34]. En favorisant une inflammation chronique, le virus peut entraîner un déséquilibre des cytokines et avec émergence d'auto-immunité, en favorisant par exemple le profil LTh1 [35]. En infectant plusieurs cellules, le virus révèle des épitopes intra-cellulaires cryptiques qui sont libérés dans le secteur extra-cellulaire lors de la mort cellulaire induite par le virus.

Autre hypothèse, le virus peut perturber la synthèse cellulaire et favoriser l'apparition ou la surexpression de peptides antigéniques : ainsi, il a été montré que le VIH agit sur la synthèse endogène de la vinculine dans les cellules T et B et favorise ainsi l'immunité contre cette protéine cellulaire [35] (fig 6).

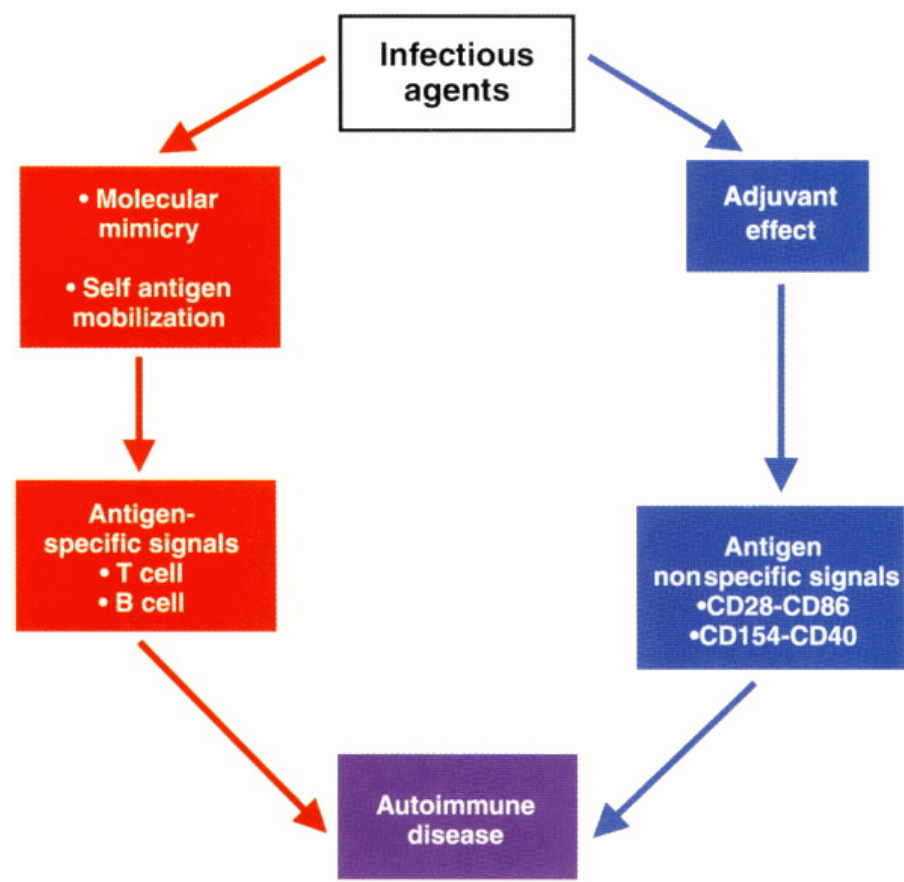


Fig 6: Hypothèse étiologique de l'auto-immunité associée aux infections [36]

Le VHC perturbe nettement la cellule en induisant un stress au niveau du réticulum endoplasmique : la présence des protéines structurales du VHC induit la synthèse de la protéine chaperonne grp78, qui est un marqueur du stress du RE [37,38]. L'infection par le VHC dans le RE inhibe la N-glycosylation des protéines; il semblerait que le virus favorise le repliement de certaines protéines et puisse empêcher la dégradation d'autres protéines mal formées. On aurait ainsi par exemple, l'accumulation de produits du CMH mal replié. NS3, protéase à sérine, est, nous l'avons vu, fortement associée au RE [39]. Elle pourrait par son activité protéolytique, de spectre assez large, favoriser l'émergence de peptides antigéniques cryptiques.

2. Protéines de stress ou HSP

Les protéines HSP (« Heat Shock Protein») sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution. Elles font partie de la famille des protéines chaperonnes. Elles sont ubiquitaires et sont les protéines solubles les plus abondantes du secteur intra-cellulaire (5-10% du contenu protéique) [40, 41]. Elles sont classées selon leur poids moléculaire (10 familles) et sont présentes dans tous les compartiments cellulaires (tableau 2) [42]

Major family, and members	Intracellular localisation	Intracellular function
Small Hsps		
α B-crystallin	Cytoplasm	Cytoskeletal stabilisation
Hsp27	Cytoplasm/nucleus	Actin dynamics
Haem oxygenase, Hsp32	Cytoplasm	Haem catabolism, antioxidant of properties
Hsp40		
Hsp40	Cytoplasm/nucleus	Regulates the activity of Hsp70; binds non-native proteins
Hsp47	ER	Processing of pro-collagen; processing and/or secretion of collagen
Hsp60 (or chaperonins)		
Hsp60	Mitochondria	Bind to partly folded polypeptides and assist correct folding. Assembly of multimeric complexes
TCP-1	Cytoplasm	
Hsp70		
Inducible: Hsp70, Hsp70hom	Cytoplasm/nucleus	Bind to extended polypeptides. Prevent aggregation of unfolded peptides. Dissociate some oligomers.
Cognate/constitutive: Hsc70	Cytoplasm/peroxisome	
Grp78/BiP	ER	ATP binding. ATPase activity. Hsp70 downregulates HSF1 activity
mtHsp70/Grp75	Mitochondria	
Hsp90		
Hsp90 (α and β)	Cytoplasm	Bind to other proteins. Regulate protein activity. Prevent aggregation of refolded peptide. Correct assembly and folding of newly synthesised protein. Hsp90 assists the maintenance of the HSF1 monomeric state in non-stressful conditions.
Grp94/gp96/Hsp100	ER	
Hsp110		
Hsp110 (human)	Nucleolus/cytoplasm	Thermal tolerance
Apg-1 (mouse)	Cytoplasm	Protein refolding
Hsp105	Cytoplasm	

ER=endoplasmic reticulum. TCP-1=tailless complex polypeptide. Grp=glucose regulated protein. Hsp70hom=testis-specific Hsp70. BiP=immunoglobulin heavy chain binding protein. mt=mitochondrial; Apg-1=protein kinase essential for autophagy. Adapted from Pockley A G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? <http://www.emmm.cbcu.cam.ac.uk/01003556h.htm> (accessed Jan 22, 2003) by permission of Cambridge University Press.

Tableau 2: Répartition des HSPs par familles [42]

En situation de stress, leur synthèse est augmentée jusqu'à 15% Elles sont capables d'interagir avec une grande variété de protéines, interaction non covalente augmentée en cas de stress cellulaire. Elles interviennent dans le repliement des protéines en se liant aux zones hydrophobes des protéines dénaturées, évitant ainsi leur agrégation [41,42].

Ce sont des molécules immunodominantes capables de générer une réponse cellulaire et humorale; il existe une grande similarité entre les HSP humaines et microbiennes laissant voir un haut potentiel de réaction croisée et donc d'auto-antigénie (HSP65 des mycobactérie et HSP60 humaine dans la maladie de Behçet, la polyarthrite rhumatoïde...) [42].

Elles interviennent dans la réponse immunitaire à plusieurs niveaux:

2.1 Rôle dans l'immunité innée :

Relarguées lors de la nécrose cellulaire (et non lors de l'apoptose), voire secrétées (mécanisme encore inconnu), elles constituent des marqueurs circulants de souffrance cellulaire secondaire aux cancers, à l'inflammation, aux infections, à la chaleur, ou à

l'ischémie [40,42]. Ainsi, il a été montré chez l'homme une élévation du taux sanguin d'HSP60 et 70 lors de l'athérosclérose précoce et de pathologies vasculaires [42, 43] Dans le secteur extra cellulaire, les HSP sont reconnues et captées à la surface des CPA par plusieurs récepteurs spécifiques (CD14, Toll like récepteurs 2 et 4). Leur fixation se traduit par la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1 β , IL6, IL12), de chémokines, et de NO. Les HSP favorisent la maturation des cellules dendritiques avec augmentation de l'expression des molécules CMH classe II, du CD80, du CD86, du CD40, et de l'ICAM1. Certaines HSP pourraient activer aussi la voie classique du complément : HSP70 peut se lier à C1q [42, 44]. Les HSP auraient donc un véritable rôle de cytokine [45,46].

2.2 Rôle dans l'immunité spécifique :

Elles représentent un signal d'alerte intra-cellulaire qui permet de détecter l'« Alien », d'informer de l'identité de l'ennemi en s'associant aux peptides antigéniques, et de favoriser leur présentation au système immunitaire [40]. Il existe une certaine homologie structurale entre les HSP et les produits du CMH : l'extrémité C-terminale des HSP contient un site de liaison aux peptides antigéniques apparentés à la gouttière des CMH de classe I [41, 47, 48]. Certains gènes des HSP sont présents la région du CMH sur le chromosome 6 [48, 49]. Les HSP constituent de véritables éponges à peptides immunogènes. Les complexes HSP-peptides (rapport 1 :1.) sont stables [50], même dans les conditions dénaturantes et peuvent être réalisés *in vitro* [41]. Secrétés ou relargués lors de la mort cellulaire, ces complexes sont reconnus par des récepteurs spécifiques présents à la surface des CPA : CD91 et CD40 [50]. S'ensuit une internalisation des complexes dans un compartiment endosomal non acide, transfert des particules dans le RE via TAP, liaison aux produits du CMH de classe I et présentation aux cellules T CD8 (fig 7). Une petite partie se répartit aussi dans le compartiment acide, permettant la liaison avec les produits du CMH de classe II et présentation aux cellules T CD4 [40, 42, 47].

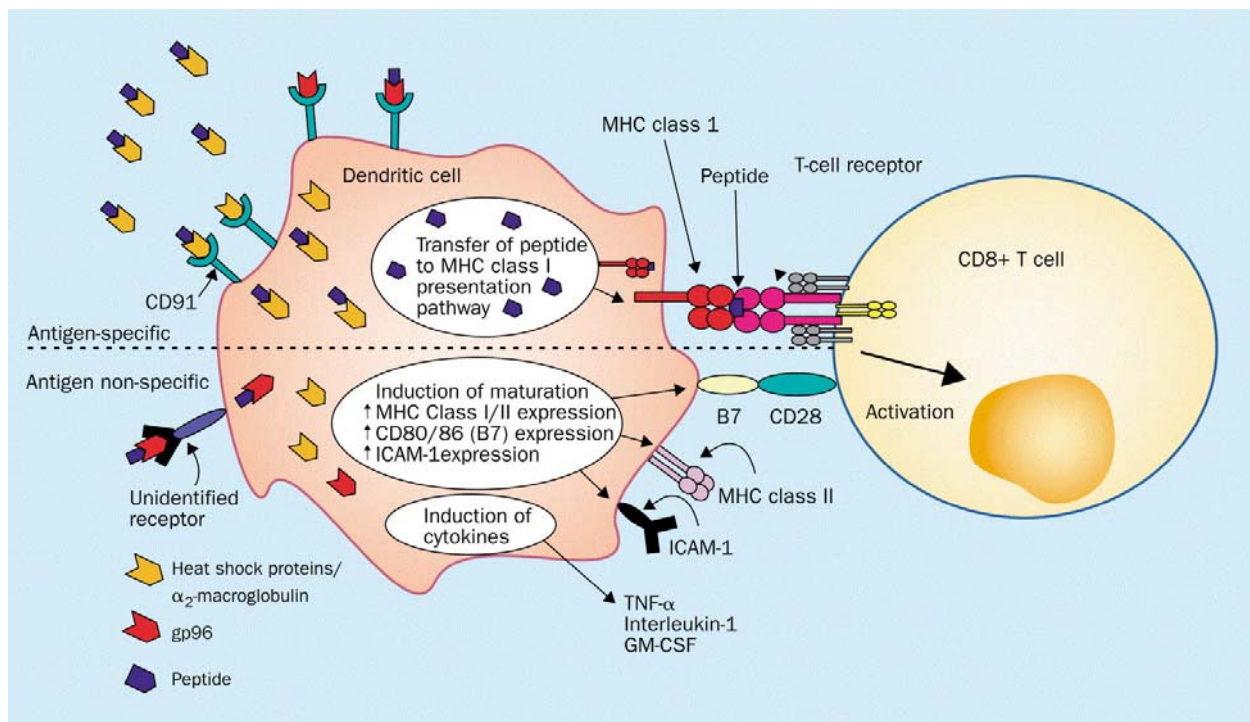


Fig 7 : Rôle des HSP dans la réponse immunitaire [42]

2.3 Les complexes HSP-peptides

Les HSP constituent les premiers adjuvants identifiés chez les mammifères: une quantité très faible d'antigènes (quelques centaines de picogrammes par ml) peut déclencher une réponse immunitaire forte s'ils sont associés à une HSP. Ces complexes sont capables de déclencher une immunité cellulaire spécifique et protectrice [41].

A partir de n'importe quel tissu ou cellules, il est possible de purifier les complexes HSP-peptides. Pionnier de cette technique, Srivastava a purifié des complexes par des techniques de chromatographies d'affinité mises au point pour différentes HSP, à partir de tumeurs cancéreuses. Il a utilisé ces complexes comme vaccin anti-tumoral, chez l'animal et chez l'homme : 50% des patients immunisés avec des complexes gp96-peptides issus de leur tumeur ont présenté une réponse T CD8 efficace et durable [41,42].

La propriété des HSP à se lier à des peptides immunogènes ouvre de nombreuses possibilités :

1. Accession à un répertoire complet d'antigènes issus de cellules cancéreuses, infectées ou soumises à un stress par une inflammation chronique sans identification préalable.
2. En purifiant les complexes HSP-peptides à partir de tissus ou de cellules, on peut avoir accès à de nouveaux antigènes cibles en identifiant les peptides liés aux HSP (ouverture des complexes par la chaleur ou en présence d'ATP par exemple).
3. Utilisation thérapeutique : stratégie vaccinale anti-tumorale ou anti-infectieuse (administration de complexes à petites doses) ou immunomodulatrice (administration de complexes à plus hautes doses) [52].

Ces propriétés pourraient être utilisées dans le cadre de l'infection chronique par le VHC pour identifier des peptides antigéniques clés responsables d'auto-immunité associée au VHC. Nous formulons l'hypothèse selon laquelle le stress cellulaire induit par le VHC favorise l'émergence de peptides cryptiques, qui associés aux HSP, seraient présentés au système immunitaire. En purifiant les complexes HSP-peptides à partir de cellules transfectées avec une partie de la polyprotéine du VHC, ces peptides seront identifiés (schéma 1). Plus particulièrement, on suggère que NS3 soit responsable de la protéolyse de certaines protéines cellulaires et favorise ainsi l'apparition d'épitopes. L'expression de NS3 est effectivement étroitement associée au RE : en présence de NS4A, elle est exprimée sur la face cytoplasmique, ancrée à la membrane grâce à la propriété amphiphile de NS4A; en l'absence de NS4A, elle peut s'exprimer dans le lumen, dépendante seulement de la coupure de la jonction NS2-NS3 par NS2. NS3 est donc mis en contact avec un ensemble de protéines cellulaires variées, susceptibles de constituer des substrats du fait de la spécificité de substrat dégénérée avec le motif D/E-X-X-X-X-C/T↓S/A [6].

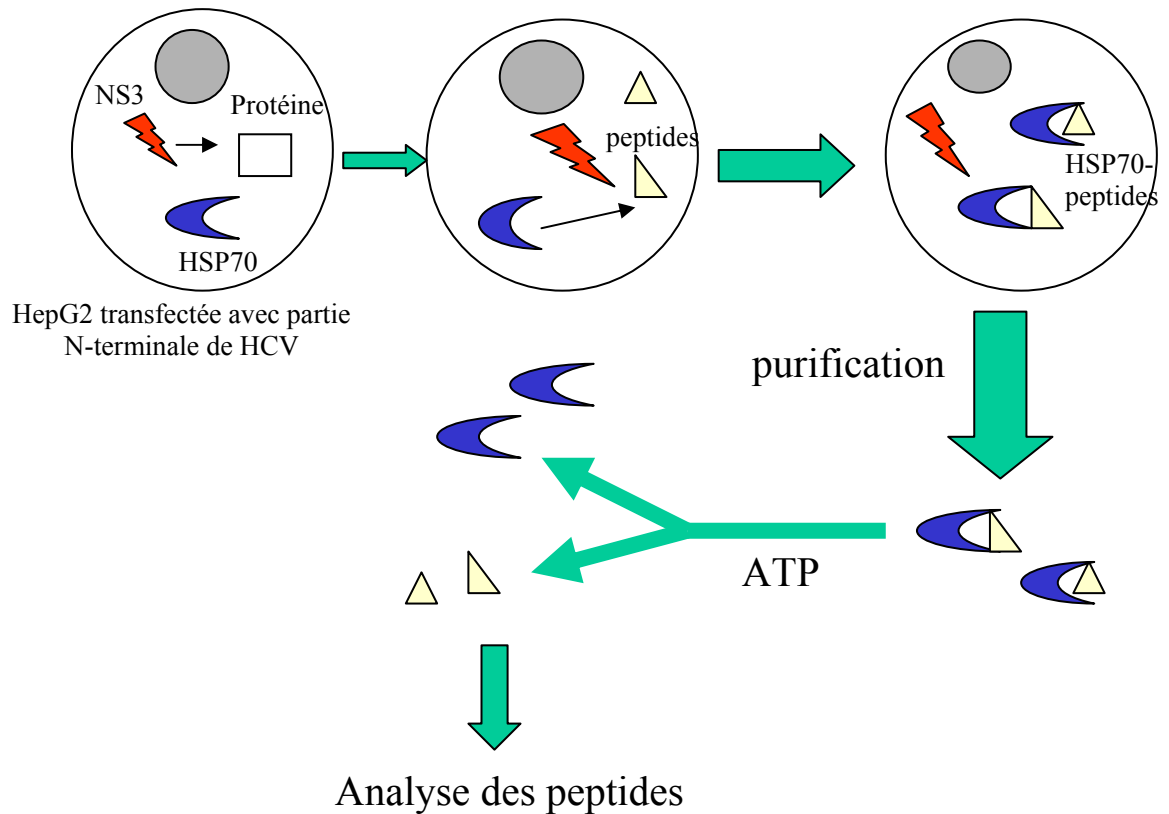


Schéma 1: Principes de la purification des complexes HSP70-peptides à partir de cellules transfectées avec une partie de la polyprotéine virale.

2.4 L'HSP70

Nous nous proposons d'utiliser le modèle de l'HSP70 pour plusieurs raisons : elle est présente dans tous les compartiments cellulaires et plus particulièrement le RE. Son implication dans la présentation de l'antigène aux CPA via les complexes HSP70-peptides est bien caractérisée à l'issue de nombreux travaux [53, 54, 55]. La famille des HSP70 est composée de 4 protéines principales. Les cellules au repos expriment une HSP70 constitutive et lorsqu'elles sont stressées une forme inducible [46, 56] (tableau 3).

Type	Mr en kDa	Abréviation
HSP70constitutive	73	HSc70
HSP70 inducible	72	HSP70
HSP70 mitochondriale	75	HSP75
HSP70 du RE	78	Grp78

Tableau 3 : Caractéristiques des différentes HSP70

Leur transcription est sous la dépendance de facteurs HSF (heat shock factor) qui se trimérisent sous l'effet du stress, sont phosphorylés et vont se fixer sur les séquences HSE (heat shock elements) situés sur les promoteurs des gènes codant pour les HSP. Il existe un rétrocontrôle négatif de l'HSP70 sur la fixation HSF sur les séquences HSE [42] (fig 8).

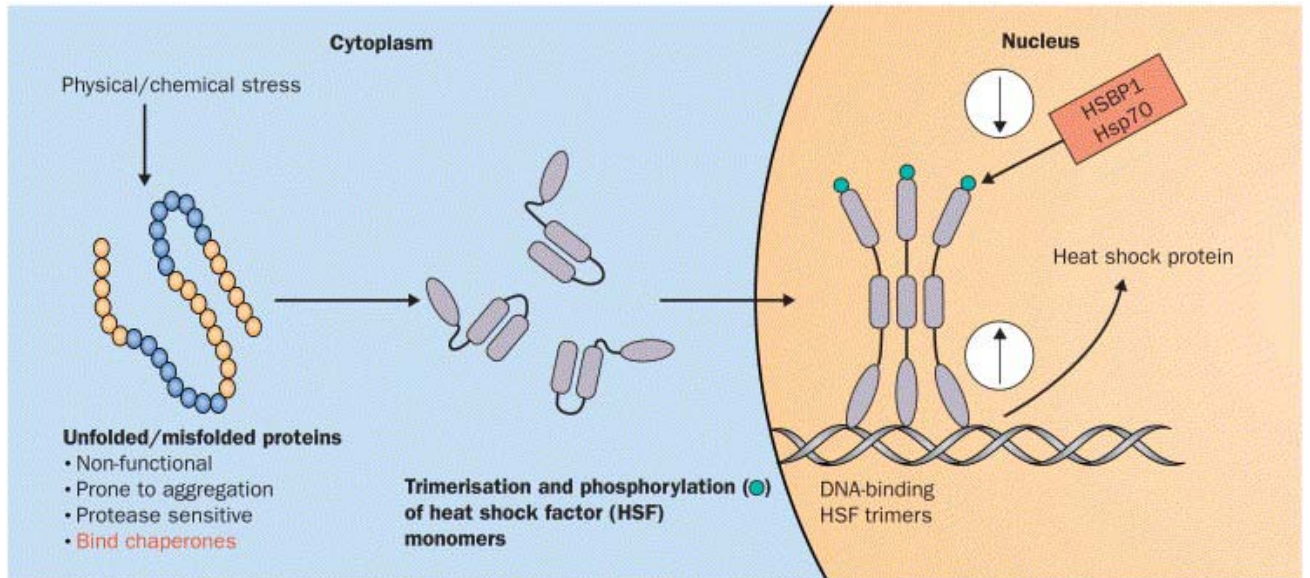


Fig 8 : Facteurs régulateurs de la synthèse d'HSP70 [42]

Les HSP70 sont composées d'un domaine N-terminal doué d'une activité ATPase et d'un domaine C-terminal avec la capacité de liaison au peptide. Ces protéines présentent deux conformations : la conformation ADP qui permet la formation de complexes HSP-peptides, la conformation ATP qui favorise la libération du peptide [46] (fig 9). Les complexes HSP70-peptides sont purifiés par chromatographie d'affinité (colonne ADP agarose) éliminant ainsi les formes libres

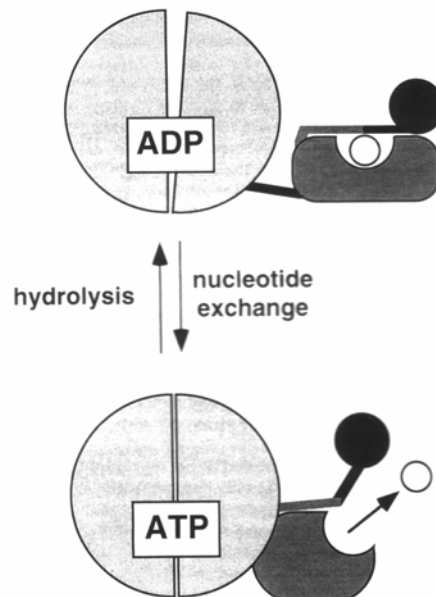


Fig 9: Différentes conformation de l'HSP70 et son impact sur sa liaison avec les peptides [57].

3. Objectifs de ce travail

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui aboutissent à une auto-immunité au cours de l'hépatite C chronique sont très mal connus. L'interaction de certaines protéines virales vis-à-vis des hépatocytes pourrait jouer un rôle. La question se pose d'évaluer, à l'aide d'un modèle cellulaire et des protéines accessibles, le rôle de la protéase NS3 dans l'évolution vers une dysimmunité.

Nous nous proposons donc d'examiner chez des patients infectés de manière chronique par le VHC :

1. Le stress cellulaire suite à l'infection par le VHC : la surexpression de l'HSP70 dans le foie de patients infectés par le VHC (technique d'immunohistochimie) et la présence d'HSP70 dans le sang des patients (reflet du stress cellulaire),
2. Le développement d'une auto-immunité associée aux protéines de stress avec l'existence d'une immunité anti-HSP70 et -90 (détection d'anticorps par technique ELISA),
3. L'association d'une immunité anti-HSP70 et 90 aux manifestations auto-immunes de l'hépatite à virus C,
4. L'activité de NS3 vis-à-vis de substrats propres à l'hôte.

Plus précisément par deux approches complémentaires,

En utilisant un modèle cellulaire HepG2 transfecté par une construction codant pour une partie de la polyprotéine virale comprenant NS3 (culture cellulaire du virus impossible à l'heure actuelle), nous nous proposons de montrer :

1. La surexpression d'HSP 70 et d'HSP 90 dans les lysats cellulaires transfectés (technique d'ELISA)
2. Une réactivité spécifique des sérums de patients infectés par le VHC, vis à vis des lysats cellulaires transfectés (techniques d'ELISA).
3. Les corrélations entre cette réactivité et des caractéristiques clinico-biologiques de l'infection par le VHC.
4. La présence de peptides liés à l'HSP70 dans les lysats cellulaires transfectés, absents des lysats témoins avec purification des complexes à partir de cultures cellulaires, puis identification par spectrométrie de masse (MALDI).

En utilisant une protéine recombinante NS3, produite chez *E. coli* nous nous proposons de montrer :

1. Le potentiel protéolytique de la protéase NS3 vis-à-vis de protéine intracellulaire : C1Inh (protéine inhibitrice des protéases à sérine), le CYP450 2D6.
2. En bloquant par l'inhibiteur spécifique BILN 2061 l'activité protéolytique de NS3 dans les cellules exprimant la partie N-terminales de la polyprotéine virale, la responsabilité de NS3 sur la présence et/ou la nature des peptides présents dans les complexes HSP70-peptides.

Matériels

1. Heat shock protéines humaines: protéines et anticorps (tableau 4)

Nom	Type	Nature	Code	Fournisseur
HSP70 inductible	Recombinante <i>E coli</i>	Humaine	NSP-555	Stressgen
HSP90	Recombinante <i>E coli</i>	Humaine	SPP-770	Stressgen
Grp78	Recombinante <i>E.Coli</i>	Hamster	SPP-765	Stressgen
Ac anti HSP72	Polyclonal	Lapin	SPA-811	Stressgen
Ac anti-HSP90	Polyclonal	Lapin	SPA-846	Stressgen
Ac anti calréticuline	Polyclonal	Lapin	PA3-900	Affinity Bioreagents
Ac anti-HSP70 inductible	Monoclonal clone C92F3A-5 IgG1, κ	Souris	SPA-810	Stressgen
Ac anti-HSP90	Monoclonal clone AC88 IgG1, κ	Souris	SPA-830	Stressgen

Nous avons aussi utilisé un anticorps de lapin anti-IgM, IgG, IgA humaines marqué à la peroxydase. (ref : P 0212 ; Dako)

2. Protéines virales et leur anticorps (tableau 5) :

	Type	Séquence	Vecteur	Origine	Laboratoire
NS3 (fig 10)	Isolat HCV-GO1, 1b Séquence Annexe 1 [58]	1027-1657 tag 6x His C-terminal	pQE6O (Quiagen) NcoI- BglII	<i>E coli</i> M15	Production du laboratoire [59]
NS3 RTS	Isolat HCV-GO1, 1b [58]	1027-1657 spacer SSG + 6 x His C- terminal	pIVEX2.3 -MCS (Roche) clonage par PCR	Système RTS (Roche)	Construction du laboratoire (non publiée)
Peptide P148	Isolat BK, 1a	1678-1691 NS4A		Neosystem (Strasbourg)	Purification au laboratoire (HPLC C4, Vydac)
Peptide substrat de NS3	Ref : M-2135	Séquence correspondant à NS4B-5A couplé à du pNA		Peptide de synthèse	BACHEM
NS5	Recombinante de fusion avec superoxyde dismutase	2054-2995			Don de Abbott
Ac anti-NS3	Polyclonal	Immunogène : 1027-1657		Lapin	Don de R Bartenschlager
Ac anti-NS3 = C33	Polyclonal	Immunogène : 1192-1459		Lapin	Elevage des Dombes Purification au laboratoire (Protéine A)
Ac anti-NS3 = 5C8B11 9C1B7 9A6C9	Monoclonaux	Immunogène : 1192-1459		Souris	Hybrisère (La Tronche)
BILN 2061	Peptide de synthèse	Inhibe la protéase NS3		Synthèse chimique	Don de Boehringer Ingelheim [60]

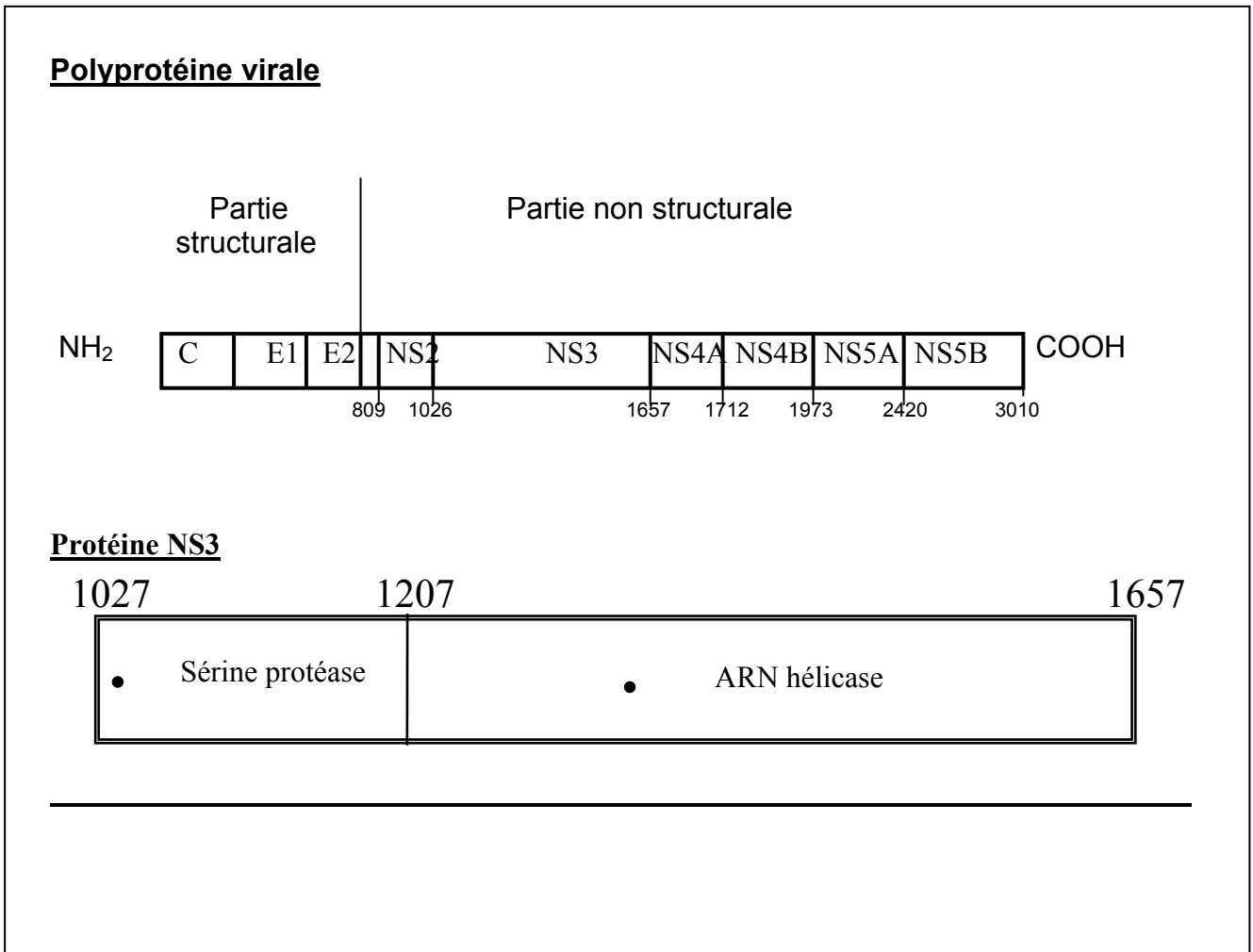


Fig 10 : représentation schématique de la polyprotéine virale du virus de l'hépatite C et de NS3

3. Autres protéines et leur anticorps (tableau 6)

Nom	Type	Origine	Laboratoire
C1Inh	Humaine	Plasma humain	Laboratoire d'immunologie
Ac anti-C1Inh	polyclonal	Lapin	Binding site
CYP450 2D6	Humaine	<i>E. coli</i>	Affinity Bioreagents
Ac anti-CYP450 2D6	polyclonal	lapin	Abcam (ab 4238-50)

4. Patients :

4.1 Patients HCV séropositifs sans manifestations extra hépatiques :

Les échantillons ont été recueillis dans le cadre d'un programme de recherche soutenu par l'ARC (1999) (patients VHC 2) et d'un PHRC (1996) (patients VHC 1) dirigé par le Pr JP.Zarski (service d'hépatogastroentérologie, CHU de Grenoble). Tous les patients ont eu un dosage des transaminases (TGO, TGP). Tous ces patients avaient une sérologie HCV positive (ELISA 3, monolisa anti-HCV plus version 2.0; Bio-Rad). La virémie par PCR quantitative a été mesurée pour chacun d'entre eux. Tous ont eu une biopsie hépatique confirmant l'hépatite C chronique (scores Métavir d'activité et de fibrose) et excluant le stade de cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Les sérums utilisés étaient prélevés avant tout traitement antiviral par interféron (IFN). Les patients étaient suivis au moins 6 mois après la fin de leur traitement pour déterminer leur statut de répondeur (virémie restant négative durant les 6 mois qui ont suivi la fin du traitement) ou non répondeur (persistance de la virémie sous traitement).

4.2 Patients HCV séropositifs avec des manifestations extra-hépatiques auto-immunes (patients VHC AI)

Il s'agit de patients issus des consultations du Pr P Miossec (service de rhumatologie, Hôpital Edouard Herriot, Lyon). Tous ces patients présentaient pour l'HCV une sérologie positive. Les données de charge virale et de biopsie hépatique n'ont malheureusement pas pu être collectées. Les signes extra-hépatiques étaient apparus après le début de l'infection par l'HCV. Ils s'agissaient de polyarthrite (8 patients), de neuropathies périphériques (21 patients) et de syndrome de Gougeröt Sjögren (10 patients), diagnostiqués sur la base des critères du consensus européen/américain [61].

4.3 Caractéristiques des populations VHC 1 et VHC AI

Les patients du groupe VHC sont essentiellement des hommes jeunes ; les patients ayant une pathologie AI associée au VHC sont surtout des femmes de la cinquantaine. Le taux d'ACAN, de FR et de cryoglobuline est comparable dans les 2 groupes (tableau 7).

	VHC 1 (30 patients)	VHC AI (20 patients)	P
Age (années) : moyenne +/- écart-type	44,8±11,5	53±13,2	ns
Durée contact VHC (années) : moyenne +/- écart-type	14,3±8	9,6±8	ns
Rapport H/F	60%	20%	ns
Cryoglobuline (fréquence)	13,3%	20%	ns
Facteur rhumatoïde (fréquence)	36,6%	35%	ns
Ac anti- nucléaire (fréquence)	10%	15%	ns

Tableau 7: caractéristiques des populations VHC 1 et VHC AI.

4.4 Patients lupiques : patients répondant aux critères de l' « American College of Rheumatology » [62] ; ils avaient tous des anticorps antinucléaires avec la spécificité anti-ADN natif ; ils avaient tous une sérologie HCV négative.

4.5 Témoins : donneurs de sang (EFS Rhône-Alpes, site de Grenoble) sains sans pathologie médicale active et dont la sérologie HCV était négative.

Patients	Origine	HCV	Durée de l'infection par l'HCV	Manifestations AI cliniques	Effectifs	Age moyen	Ratio H/F
VHC2	ARC (Grenoble)	Oui	16,1+/-6 ans	Non	40	43.7 ans	70%
VHC1	PHRC (Grenoble)	Oui	14,3+/-8 ans	Non	30	44.8 ans	60%
VHC AI	Pr P Miossec (Lyon)	Oui	9,6+/-8 ans	Oui	20	53 ans	20%
Lupus	Laboratoire d'immunologie (Grenoble)	Non		Oui	17	36 ans	12%
Témoins	EFS (Grenoble)	Non		Non	18	43 ans	72%

Tableau 8: caractéristiques des différents groupes de patients

5. Biopsies hépatiques :

Elles ont été analysées par immunohistochimie

Patients HCV séropositifs, (VHC 1) classés en 2 groupes : répondeurs ou non au traitement par interféron. Les biopsies hépatiques étaient réalisées avant toute initiation d'un traitement.

Témoins négatifs : biopsies hépatiques issues de prélèvements chirurgicaux chez des personnes HCV séronégatives sans hépatopathie active.

Les biopsies sont paraffinées et coupées avec une épaisseur de 5µm.

6. Souches cellulaires (tableau 9)

Elles sont réalisées à partir de cellules HepG2 (HB-8065 ATCC).

6.1 Cellules HepG2NT :

Des cellules HepG2 ont été transfectées par une construction exprimant la partie N-terminale de la polyprotéine virale souche 1a (1-1657, don Pr Bréchet, Inserm U370, Paris). Le vecteur utilisé (pEF352 neo) présente l'insert sous la dépendance du promoteur EF-1α. Cette partie N-terminale de la polyprotéine virale comprend le core, E1, E2, NS2 et NS3 (schéma 2) [63]. Ces cellules sont appelées HepG2NT.

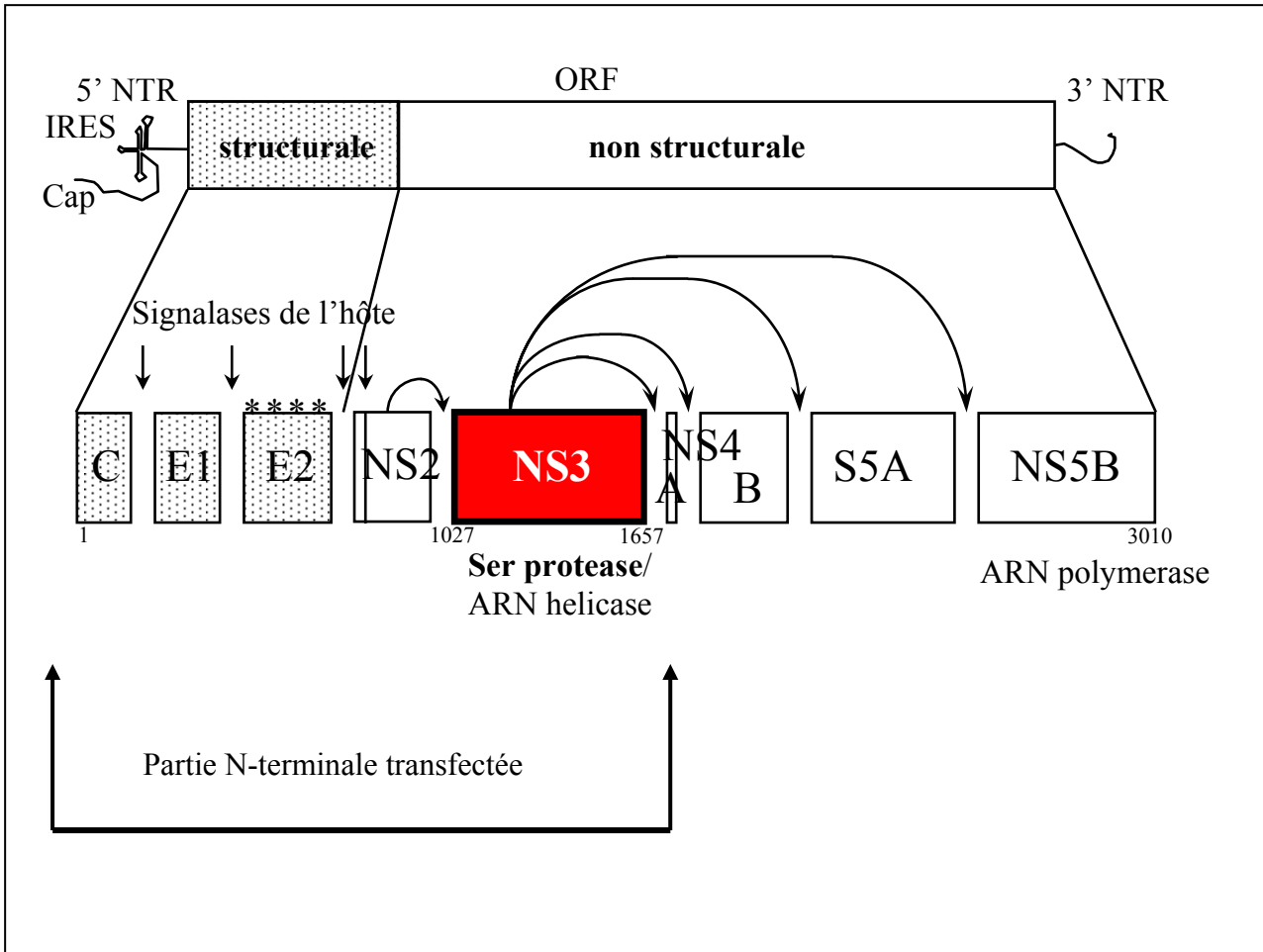


Schéma 2: représentation de la partie N-terminale de la polyprotéine du VHC exprimée par les cellules HepG2 NT

6.2 Cellules HepG2NT transfectées avec le minigène C1Inh :

Le minigène (annexe 2) a été construit pour l'expression de C1Inh ; il comprend la partie 5' du gène (1182 nt) et les introns 1 et 2, avec une configuration ADNc à compter de l'exon 3 et plus de 3kb de séquence 3' non codante [64]. Le minigène a été transfecté avec le réactif de type non liposome Fugène 6 (Roche Applied Science, Meylan) dans le rapport 5 µg d'ADN pour 15 µl de réactif et 10⁶ cellules et en suivant les indications du fournisseur.

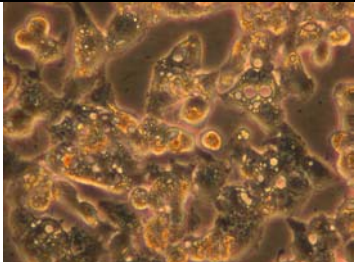
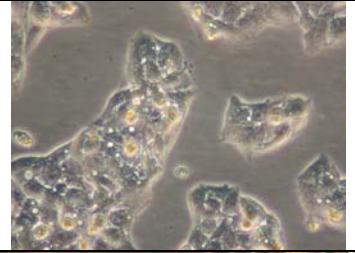
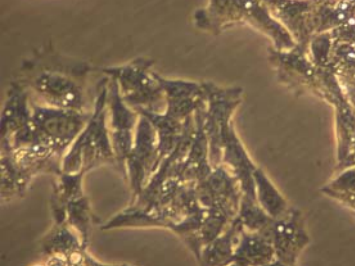
Nom	Vecteur	Insert	Promoteur	Minigène C1Inh	Photo
HepG2	Sans	Sans	Sans	Non	
HepG2 SW	pEF352 neo	Sans	EF-1 α	Non	
HepG2 NT	pEF352 neo	1-1657	EF-1 α	Non	
HepG2 NT C1Inh	pEF352 neo	1-1657	EF-1 α	Oui	

Tableau 9: caractéristiques des différentes souches cellulaires utilisées.

Méthodes :

1. Immunohistochimie anti-HSP70 sur biopsies hépatiques

Les lames sont déparaffinées dans de l'alcool éthylique 100° 2 fois, pendant 2 minutes. Les peroxydases endogènes sont bloquées dans du méthanol/H₂O₂ 0,3% pendant 20 minutes. Les lames sont rincées à l'eau puis mises dans du tampon citrate, dans une cocotte jusqu'à 2 minutes après que la soupape ait tourné. Les lames sont de nouveau lavées à l'eau puis avec un tampon PBS BSA3% (pH compris entre 7.4 et 7.7). Les lames sont ensuite incubées 1h avec l'anticorps anti-HSP70 dilué au 1/500^e dans le tampon PBS BSA. Après un nouveau lavage avec PBS BSA, les lames sont incubées avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-souris pendant 1 h (dilué au 1/100^e dans le tampon PBS). La révélation a lieu avec le KIT de la marque Vector (Vectastain Elite ABC, kit PK-6100) avec le chromagène DAB (ref : D4293, Sigma). Une contre coloration est réalisée avec l'hématoxyline.

2. Production et purification de NS3 dans *E.coli* :

La construction est introduite dans le vecteur pQE60 (Qiagen) qui permet la production de la protéine recombinante NS3 (Mr 70 kDa, 659 résidus). L'insert ADNc codant pour la protéine virale (isolat HCV-GO1, type 1b) est exprimé sous le contrôle du promoteur lacZ, dans la souche *E.coli* M15 hébergeant en permanence le plasmide pRep4 codant pour le répresseur lactose, en présence de kanamycine. La protéine recombinante couvre la séquence 1027-1657 (NS3) et présente un tag 6 histidine en position C-terminale nécessaire à l'étape de purification par affinité. La synthèse des protéines est induite par l'isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) qui se fixe au répresseur lactose et libère ainsi le promoteur LacZ. Chaque clone bactérien est étalé sur gélose 2xYT, en présence d'ampicilline (100 µg/ml), de kanamycine (25 µg/ml) et de ZnCl₂ (10 µM). Une colonie est mise en culture stationnaire la nuit dans 3 ml du milieu 2xYT, puis en culture exponentielle dans 1 litre du milieu 2xYT en présence d'IPTG (2 mM, 6 h). Les bactéries sont alors centrifugées (Rotor JA 21, Beckman; 15 minutes, 4500 t/min, 4°C); le surnageant est éliminé. Le culot peut être conservé dans la glace une nuit au maximum.

Le culot est repris par 5 ml de tampon de sonication (NaCl 600 mM; NaH₂PO₄ 50 mM, beta-mercaptoethanol 1 mM, pH 7,8) puis soumis aux ultrasons (6 cycles de 30 s) pour disperser les protéines recombinantes intracellulaires.

La première étape de purification de NS3 consiste en une chromatographie de gel avec une colonne de Sephacryl S300 superfine (120 cm de long; 2,7 cm de diamètre, Pharmacia Biotech) qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le sonicat est centrifugé (4°C, 27 000 g, 20 minutes); le surnageant est alors déposé sur le gel; les protéines sont éluées au débit de 10 ml/h par le tampon de sonication. Chaque fraction éluee est analysée par l'absorbance à 280 nm et par électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Les tubes sont sélectionnés suivant la masse relative (Mr) des protéines.

La deuxième étape fait appel à une chromatographie d'affinité sur NiNTA® agarose (Qiagen); les résidus histidine ont une forte affinité pour le nickel de la matrice ce qui permet de retenir les protéines virales recombinantes. Les fractions d'élution sélectionnées précédemment sont déposés sur la colonne d'affinité (800 µl de résine); l'élution a lieu en présence d'imidazole (compétition des histidines pour le nickel) à des concentrations de 20 mM, 40 mM, 100 mM et 250 mM. Les protéines éluées sont recueillies et identifiées par Immunoblot anti-NS3 (Ac anti-NS3 lapin). Les protéines obtenues sont quantifiées sur gel de polyacrylamide par référence à l'ovalbumine, après coloration par le bleu de Coomassie.

3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS :

Les échantillons sont soumis à l'électrophorèse en gel de séparation à 10% d'acrylamide, 1,5 mm d'épaisseur (10 cm x 7,4 cm). Un gel de concentration à 4% d'acrylamide est utilisé pour les dépôts. La migration a lieu dans un tampon (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,8) pendant 1h à 175 V. Les gels sont ensuite soit colorés par le bleu de coomassie 0,15% (acide acétique 9%, éthanol 45%) puis décolorés (acide acétique 7,5% et éthanol 5%), soit soumis à un immunotransfert.

Selon le cas, les échantillons sont réduits par 1 volume de DTT 100 mM (5 min à 100°C) et carboxyméthylés avec un volume d'iodoacetamide 400 mM (20 min à 37°C) ou ne sont pas réduits et ajoutés à un volume de tampon Tris 0,2 M, SDS 2%, urée 8 M, iodoacetamide 20 mM et incubés 5 min à 100°C.

4. Western Blot

Les protéines des gels peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose (BA85, Schleicher et Schuell). La membrane et le gel sont immergés 30 minutes dans le tampon de transfert (Tris 25mM, glycine 192 mM, méthanol 20%) puis étroitement accolés dans la cassette de transfert (transblott, Biorad) ; le transfert a lieu pendant 1h à 100 volts. La membrane est saturée 1 nuit dans le tampon TBS-tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, tween 20 0,1%, pH = 7,4). Elle est ensuite incubée 2h à température ambiante, sur agitateur en présence de l'anticorps à la dilution optimale dans le tampon TBS-tween. La membrane est lavée 6 fois par le tampon TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH = 7,4) et elle est soumise à révélation par l'anticorps conjugué à la peroxydase approprié. Après une série de 4 lavages, l'activité peroxydase est révélée par la solution de 4-chloronaphtol (0,05% dilué dans le tampon TBS, H₂O₂ 30%, méthanol 23%).

5. Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées avec un milieu RPMI 1640, 10% SVF décomplémenté. Dans ce milieu ont été ajoutés du pyruvate de sodium 1mM, de la glutamine 2 mM, des acides aminés non essentiels d'Eagle 1%, du β-mercaptoéthanol 50 μM, des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline, 100μg/ml de streptomycine) et des antifongiques (0,25 μg/ml d'amphotéricine B). Les cellules sont décongelées dans la main. 1 ml de milieu est versé goutte à goutte en 1 minute dans la glace; puis 2 ml en 1 minute puis 4 ml en 1 minute puis de nouveau 4 ml en 1 min à température ambiante. Les cellules sont centrifugées (5 min, 400 g, T° ambiante) et lavés 2 fois avec du RPMI 10% SVF. Les cellules sont ensuite comptées et mises en culture dans le même milieu que précédemment. Il s'agit de cellules adhérentes. Elles sont placées à 37°C sous 5% de CO₂.

Les cellules HepG2NT sont cultivées en présence de généticine (1 mg/ml, InVitrogen). La présence de NS3 a été vérifiée par immunoprécipitation après un marquage métabolique au ³⁵S (marquage cystéine et méthionine) et immunoprécipitation avec l'Ac anti-NS3 de lapin (C33).

Les cellules témoins HepG2SW sont cultivées dans les mêmes conditions avec la généticine. Les cellules HepG2 témoins sont cultivées dans les mêmes conditions mais sans généticine.

Certaines cultures cellulaires ont été faites avec le BILN 2061 (inhibiteur de NS3) qui a été ajouté au milieu de culture dès la décongélation des souches cellulaires à la concentration finale de 30 nM [65] _

6. Préparation de lysats cellulaires:

Les cellules sont lavées 2 fois avec la solution de Hanks, puis le tampon de lyse (CHAPS 2%, iodoacétamide 20 mM, PMSF 1 mM, pepstatine 10 µg/ml, leupeptine 10 µg/ml, HEPES 50 mM, NaCl 200 mM, pH = 7,2) est déposé sur les cellules pendant 10 minutes à 4°C. Le tapis cellulaire est gratté et les cellules sont recueillies puis centrifugées (30 minutes à 10 000 x g à 4°C). Les lysats cellulaires sont dosés en protéines (micro BCA assay, Pierce-Interchim, Montluçon, France) et aliquotés par 50 µl puis stockés à -80°C.

7. Evaluation du taux d'HSP dans les lysats par méthode ELISA (d'après la méthode décrite dans la référence [66])

100 µl de lysat cellulaires sont déposés dans chaque puits d'une plaque de microtitration (Nunc, F96 Maxisorp) à la concentration de 10 µg de protéine /ml de tampon (0,02% NaN₃, 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6) et incubé 1 nuit à 4°C. Chaque dosage est répété 12 fois. Après blocage avec PBS tween 0,05% BSA 3%, 100 µl par puits d'anticorps polyclonaux de lapin anti-HSP70 (1/1000e), anti-HSP90 (1/1000^e), anti-calréticuline (1/750^e) dilués dans du PBS tween 0,05% BSA 3% sont déposés et incubés 2h à température ambiante. Après 4 lavages, 100 µl par puits d'anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (1/2 000e) sont déposés et incubés pendant 2 h à température ambiante. Après 4 nouveaux lavages, l'activité enzymatique est révélée par 3 mg/ml d'OPD (Sigma), 0,8 µl 30% H₂O₂ pendant 10 minutes dans l'obscurité. La réaction est stoppée avec 25 µl de H₂SO₄ 8 N et l'absorbance est lue à 492 nm.

La spécificité de la détection des HSP est confirmée relativement à la réaction avec des anticorps polyclonaux de lapin non immunisé.

8. Dosage des anticorps anti-lysats par méthode ELISA:

Les lysats cellulaires sont dilués dans un tampon carbonate-bicarbonate (0,02% NaN₃, Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH= 9,6) à une concentration de 10 µg/ml de protéines. Chaque puit est sensibilisé avec 100 µl de lysats pendant 1 nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite saturées avec du PBS lait écrémé en poudre 10% (100 µl dans chaque puit), 1 h à T° ambiante. Après avoir vidé la plaque, on dépose 100 µl de sérum dilué au 1/50^e dans du PBS tween 20 0,05% lait 5% 1 h à T° ambiante. On lave 4 fois avec du PBS tween 20 0,05% puis on dépose 100 µl d'Ig anti-Ig humaine marquée à la peroxydase (1/750^e dans du PBS tween 20 0,05% lait 5%) 1h à T° ambiante. Après 4 lavages avec du PBS tween 20 0,05%, on révèle avec le substrat OPD (Sigma) dilué dans un tampon acétate 0,05 M (pH = 5) 30% H₂O₂ au 1/1000^e (100 µl par puit). Après 15 minutes dans l'obscurité, la réaction est stoppée par 25 µl/puit de H₂SO₄ 8N. La densité optique est mesurée à 492 nm.

9. Evaluation du taux d'anticorps anti-HSP dans les sérum de patients (méthode ELISA)

Nous utilisons des plaques de microtitration (Maxisorp, Nunc) de 96 puits. Chaque protéine chaperonne est diluée dans un tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M à pH 9,6 (5 µg/ml). 100 µl de préparation est déposé par puits pendant une nuit à 4°C.

Les plaques sont alors saturées pendant 2 h à température ambiante avec du PBS tween (0,05%) et BSA (2%). Les puits sont lavés 4 fois avec du PBS tween (0,05%). 100 µl de sérums dilués au 1/100^e dans du PBS tween (0,05%) BSA (1%) sont déposés dans chaque puit et laissés pendant 2h à température ambiante. De nouveau, 4 lavages ont lieu avec du PBS

tween. Chaque puits est incubé avec 100 µl d'Ig anti-Ig humaine (G, M, A) marquées à la peroxydase (DAKO), diluées au 1/500^e dans du PBS tween BSA 1% et laissés 1h à température ambiante. Après 4 lavages avec du PBS tween, on révèle avec le substrat OPD dilué dans du tampon acétate 0,05 M (pH = 5) auquel on ajoute de l'H₂O₂ 30% au 1/1000^e. On fait des dépôts de 100 µl par puit. Après 15 minutes dans l'obscurité, la réaction est stoppée par 25 µl/puit de H₂SO₄ 8 N. L'absorbance est mesurée à 492 nm.

10. Dosage de l'antigénémie HSP70 par méthode sandwich dans le serum de patients

Chaque puits (même plaque de mirotitration que précédemment) est incubé avec 100 µl d'anticorps anti-HSP70 monoclonal de souris (à la concentration de 5 µg/ml dans un tampon carbonate, pH = 9,6), une nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées 6 fois dans un tampon PBS tween 20 0,05%. Chaque puits est bloqué une heure à 37°C avec du PBS tween 20 0,05% BSA (2%). Six lavages sont ensuite réalisés avec du PBS tween 20 0,05%. Dans chaque puits, 100 µl de sérum non dilué sont incubés pendant 2 heures à 37°C. De nouveau 6 lavages sont réalisés. On dépose ensuite 100 µl d'anticorps monoclonal de lapin anti-HSP70 dilué au 1/400^e dans du tampon PBS tween 20 0,05%, BSA 1%, 1 heure à 37°C. De nouveau, 6 lavages sont réalisés. On dépose ensuite 100 µl d'anticorps anti-Ig de lapin marqué à la peroxydase dilué au 1/10000^e dans du tampon PBS tween 20 0,05% BSA 1%, 1 heure à 37°C. Après 6 lavages avec du PBS tween 20 0,05%, on révèle avec le substrat OPD dilué dans du tampon acétate 0,05 M (pH = 5) auquel on ajoute de l'H₂O₂ 30% au 1/1000^e. On fait des dépôts de 100 µl par puit. Après 15 minutes dans l'obscurité, la réaction est stoppée par 25 µl/puit de H₂SO₄ 8 N. L'absorbance est mesurée à 492 nm.

11. Purification et analyse des complexes HSP-peptides:

11.1 Préparation des lysats cellulaires en vue de la purification de complexes HSP-peptides :

Les cellules HepG2 sont décollées par de la trypsine EDTA 10x (0,5% trypsine, 5,3 mM ; Gibco) diluée au 1/10 dans du Hanks (10%). Les culots sont ensuite lavés 2 fois avec du Hanks SVF 10%, puis 2 fois avec du PBS. Le culot cellulaire est ensuite mis dans 4 fois son volume de tampon de lyse hypotonique (10 mM NaHCO₃, 5 mM de DFP, pH= 7,2). En chambre froide, le mélange est homogénéisé dans un système Potter (vitesse 50 ; 20 allers – retours). Lorsque plus de 80 % des cellules sont lysées, elles sont centrifugées à 200 000 g pendant 1h (50 000 RPM à 4°C, ultracentrifugeuse « Beckman optima » L60, rotor Ti50). Le surnageant est récupéré et peut être stocké à -80°C.

Ces différentes étapes sont réalisées pour les cellules transfectées et les cellules témoins de la même façon.

Le surnageant est dialysé une nuit en chambre froide contre le tampon D (20 mM Tris-HCl, 20 mM Na Cl, 15 mM β-mercaptoethanol, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, pH à 7.5). Le surnageant est ensuite filtré (Durapore 0,22 µm, Millipore). Les protéines totales sont mesurées par micro BCA selon les indications du fournisseur.

11.2 Chromatographie d'affinité par colonne ADP agarose :

Une colonne (Biorad) de 15cm x 1cm est préparée avec de l'ADP agarose (Sigma). La colonne est lavée avec le tampon D puis sont déposés les échantillons cellulaires ; la colonne est ensuite lavée avec du tampon D 0,5 M NaCl puis avec du tampon D seul jusqu'à ce qu'aucune protéine ne soit plus détectée dans le lavage (micro méthode Bradford). L'éluion a lieu avec de l'ADP 3 mM dilué dans le tampon D.

Les échantillons cibles (contenant les complexes HSP70-peptides) sont poolés et dialysés avec un tampon E (20 mM de phosphate sodium et 20 mM NaCl ; pH à 7). Puis, les protéines sont concentrées avec le système « concentrator 30 » : centriplus/amicon (3000 x g à 4°C).

11.3 Chromatographie d'échange d'ions HPLC (mono Q HR5/5 ; Pharmacia Biotech) :

Les échantillons sont séparés sur une colonne échangeuse d'anions mono Q. La colonne a été équilibrée avec le tampon E. Elle est chargée avec 5ml d'échantillon. Le débit est de 0,5ml/min. On élue par un gradient de NaCl 20-600 mM. Toutes les fractions (250 µl) sont gardées sur glace. Les tubes sont analysés par microbradford pour le contenu protéique et ELISA anti-HSP70 pour le contenu en HSP70. Les échantillons cibles (complexes HSP70-peptides) sont ensuite congelés à -80°C.

11.4 Dissociation des complexes HSP70-peptides:

Les échantillons contenant les complexes (retenus précédemment et concentrés) sont incubés avec 10 mM d'ATP et 3 mM MgCl₂ à T° ambiante pendant 1h, puis soumis à une ultrafiltration pendant 1 h à 4°C (système Centricon YM10). Les ultrafiltrats sont récupérés et dilués dans du TFA à une concentration finale de 0,065%. Une partie des échantillons est déposée sur un gel SDS-PAGE. Les bandes correspondants à la protéine HSP70 sont découpées, puis lavées (bicarbonate ammonium 25 mM, bicarbonate ammonium 25 mM / acétonitrile 50%). Il y a ensuite réduction alkylation (H₂O₂), digestion trypsique (300 ng) puis analyse par MALDI-TOF-MS.

11.5 Séparation des peptides

L'autre partie des échantillons contenant les peptides sont séparés par une colonne de phase inverse HPLC (C18 Vydac ; 150 mm x 2.1mm) avec un débit de 200 µl/min. L'élution a lieu avec un gradient de 0-80% d'acétonitrile, 0,05% TFA avec une pente de gradient de 0,4% / min pendant 4 h. Les échantillons sont recueillis par fraction de 100 µl et contrôlés en Absorbance à 205, 215 et 280 nm.

11.6 Analyse de la masse des peptides par Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-Of-Flight (MALDI-TOF)



Photo 1: Spectromètre de masse MALDI-TOF (Voyager Elite XL, Applied Biosystems) du laboratoire de spectrométrie de masse de l'institut de biologie structurale de Grenoble (B.Dublet et E. Forest).

Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse qui génère des spectres permettant de déterminer la masse de peptides présents dans un mélange protéique trypsinisé. Les échantillons à analyser sont transformés sous forme de cristal et déposés sur une plaque de métal. Dans la chambre du MALDI, un rayon laser percute le cristal et des fragments ionisés sont propulsés hors de la plaque et sont accélérés à haut voltage (schéma 3). Ils volent ensuite dans un tunnel sans champs électrique où est calculé leur temps de passage (Time-Of-Flight). Les temps de passage sont convertis en masse en calculant le rapport de la masse sur la charge du fragment. La quantité relative est enregistrée pour chaque masse (normalisée à partir de la masse la plus abondante). Un échantillon peut contenir plusieurs fragments de même masse, car la trypsine coupe toujours au même endroit les multiples copies de la protéine. Cette signature de l'enzyme produit les spectres de masse, générés à l'aide du logiciel Voyager Elite (Applied Biosystem). Ce logiciel exécute une suite d'instructions et de paramètres permettant à l'appareil de produire des spectres pour chaque puits de la plaque. Cette suite d'instructions est appelée une séquence de MALDI. Les fichiers (format binaire) sont convertis en format texte et analysés par des algorithmes qui comparent les masses expérimentales à d'autres masses digérées théoriquement venant de banques de protéines. C'est une première étape dans l'identification protéique mais révèle des limites lorsque les fragments peptidiques sont en faibles concentrations.

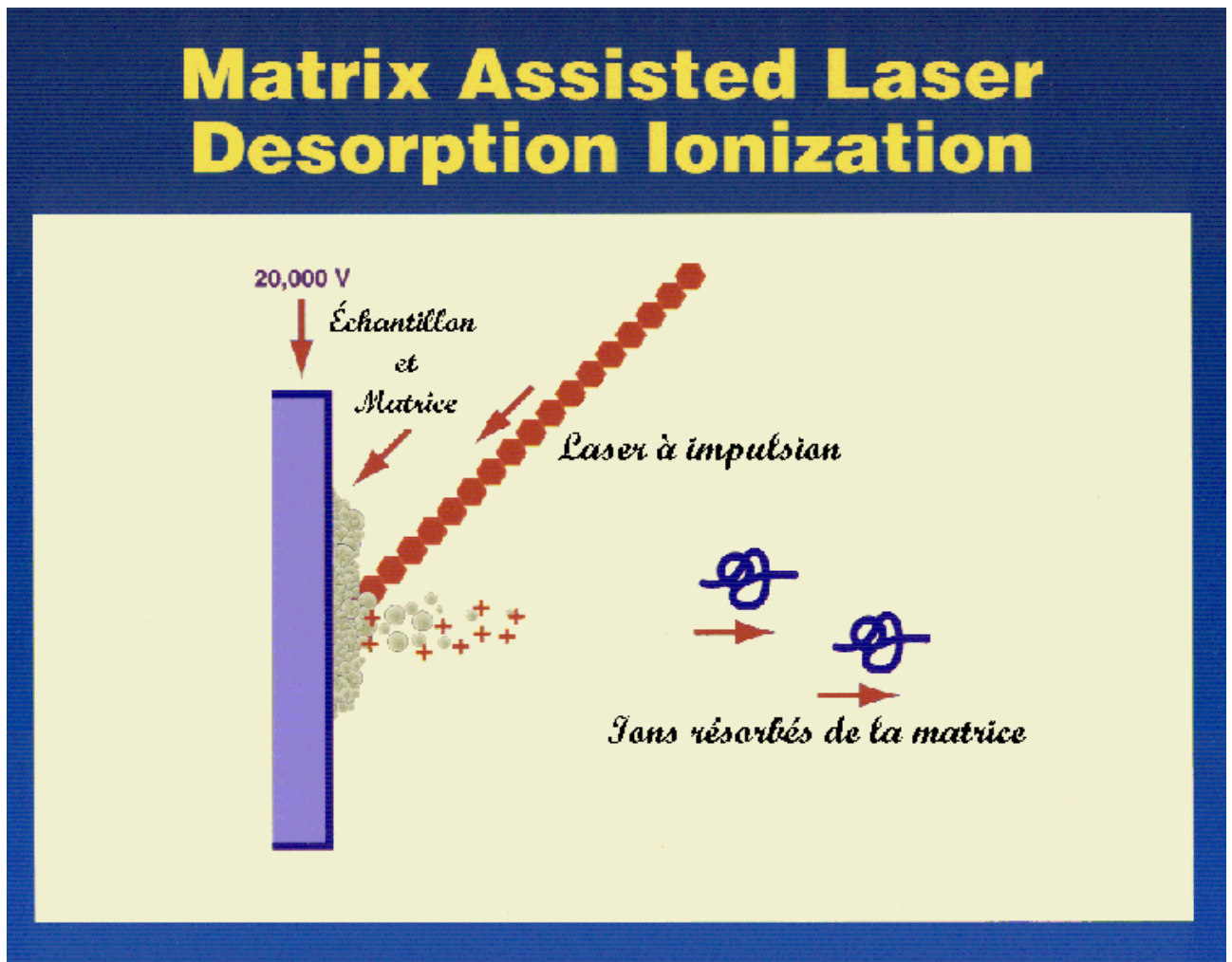


Schéma 3 : principe du MALDI

11.7 Analyse par chromatographie couplée au spectre de masse (L. Kuhn et J. Garin, laboratoire de chimie des protéines, DRDC, CEA)

L'approche de spectrométrie de masse en tandem à trappe ionique (LC-MS/MS) est plus sensible. Les peptides sont séparés par HPLC à l'intérieur d'une colonne de chromatographie selon leur hydrophobicité en avançant dans un flux constant d'un gradient d'acétonitrile. Ils entrent ensuite dans une chambre à ions remplie d'un gaz neutre et le spectromètre génère un premier spectre de masse (similaire à celui du MALDI-TOF). Puis chaque masse est isolée à l'intérieur de la trappe ionique par des champs électriques variables et fragmentée par des collisions avec les atomes de gaz (dissociation collisionnelle). Les liens peptidiques sont rompus et le produit final donne des sous fragments de diverses longueurs ayant des masses différentes. Les sous fragments les plus courts représentent un acide aminé (AA). Puisque chaque masse des AA est connue et spécifique, la reconstitution des sous fragments à leur masse originale permet de déterminer la séquence peptidique du fragment initial.

12. Activité protéolytique de NS3

12.1 Réaction entre C1Inh et NS3

C1Inh est incubé avec des quantités croissantes de NS3 dans 15 µl de tampon (Tris 10 mM, Na Cl 80 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, o-mercaptoethanol 0,2 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, imidazole 10 mM, pH 7), une nuit à 37°C.

Des inhibiteurs de protéase sont incubés à la concentration indiquée ci-dessous avec 1,2 µg de NS3 dans 6 µl de tampon, 30 min à 37°C, préalablement à l'incubation avec la serpine.

Les inhibiteurs suivants ont été utilisés:

- N[□] - Tosyl - Phe chloromethyl Ketone (TPCK), inhibiteur irréversible des protéases type chymotrypsine (Calbiochem) : 0,2 mM et 0,05 mM concentrations finales.
- N[□] - Tosyl - Lys chloromethyl Ketone (TLCK), inhibiteur irréversible des protéases type trypsine (Calbiochem) : 0,2 mM et 2 mM concentrations finales.
- Diisopropyl fluoro-phosphate (DFP), inhibiteur irréversible des protéases à sérine et acétylcholinestérases (Sigma) : 5 mM et 10 mM concentrations finale.

L'échantillon comprenant NS3 et C1Inh est incubé en présence d'hydroxylamine (Sigma) 1 M final, Na Cl 1,29 M, pH 9 ; 2 heures à 37°C. L'hydroxylamine a la particularité de rompre uniquement les liaisons esters.

12.2 Réaction entre NS3 et un substrat peptidique correspondant à la séquence de coupure NS4B-5A.

NS3 à la concentration finale de 20 mM est incubé avec son peptide substrat (NS4B-NS5A couplé avec le para-nitroanalline, concentration finale de 200 µM) dans 500 µl de tampon (Tris-HCl 10 mM, Na Cl 80 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, o-mercaptoethanol 0,2 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, imidazole 10 mM, pH 7) en présence de NS4A (15 µM), à différents temps à 37°C. La coupure du peptide libère du para-nitroanalline que l'on met en évidence avec un e absorbance de 405 nm.

Le C1Inh et les anticorps anti-NS3 (anticorps monoclonaux murins) sont incubés préalablement avec NS3 seule une nuit à 37°C à la concentration finale de 40 nM.

12.3 Réaction entre le cytochrome P450 2D6 et NS3 RTS

NS3 RTS (0,12 nM) et le peptide P148 (1,8 nM) sont incubés préalablement 10 minutes à 30°C dans un tampon Hepes 100 mM, DTT 2 mM, ZnCl₂ 1 mM, Glycérol 30%, CHAPS 2%, pH à 7.5. Puis le CYP450 2D6 (0,055 nM) est rajouté. Les protéines sont incubées à 37°C

pendant 7 jours. Les échantillons sont analysés sur gel SDS PAGE coloré en bleu de Coomassie et soumis à l'immunoblot marqué avec l'anticorps anti-CYP 450 2D6.

13. Analyses statistiques

Les données (variables quantitatives) sont analysées avec les tests non paramétriques de Wilcoxon et de Mann Whitney. On considère comme significatif un $p < 0,05$. Les coefficients de corrélation (analyses univariées) entre les variables quantitatives sont calculés avec le test des rangs de Spearman avec $p < 0,05$ considéré comme significatif. Les calculs sont réalisés grâce au logiciel « Statview® ».

Résultats

1. Expression des protéines de stress dans le contexte de l'infection chronique par le VHC

Le premier objectif de ce travail était de déterminer si, chez les patients atteints d'hépatite C chronique, il y avait une surexpression des protéines de stress (au niveau hépatique et périphérique) et s'il y avait l'expression d'une immunité anti-HSP.

1.1 Aspects immunohistochimiques anti-HSP70 des biopsies hépatiques

Nous avons voulu vérifier si le tissu hépatique de patients infectés par le VHC surexpriment l'HSP70. Des coupes de biopsies hépatiques de patients ayant une hépatite C chronique ont été soumises à un immunomarquage anti-HSP70. Le témoin négatif était une biopsie hépatique normale et le témoin positif correspondait à une biopsie d'adénocarcinome gastrique [67].

Nos résultats sont résumés dans le tableau 10:

- L'observation des lames du foie sain, ne montre aucun marquage (ni nucléaire ni cytoplasmique) sur les cellules hépatocytaires, les lymphocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires. On note par contre un marquage nucléaire faible au niveau des canaux biliaires.
- L'observation des lames correspondant au témoin positif montre un marquage au niveau des noyaux.
- Les biopsies hépatiques de 5 patients ayant une hépatite C chronique et considérés comme répondeurs ont été observées. Les biopsies de 4 de ces patients présentent une fixation nucléaire dans au moins 50 % des hépatocytes. On note aussi pour quelques hépatocytes (10%), une fixation cytoplasmique granuleuse et circonscrite. Les canaux biliaires sont marqués comme pour le témoin négatif. Aucun de ces patients n'avait de signe de surcharge ferrique sur leur biopsie hépatique.
- 4 patients ayant une hépatite C chronique et considérés comme non répondeurs ont été analysés pour l'expression de HSP70 dans le tissu hépatique. La coloration nucléaire et cytoplasmique est comparable à celle du témoin négatif. Un patient présente quelques granules cytoplasmiques dans quelques cellules hépatocytaires (moins de 5 %).

Ces observations montrent que les patients VHC positifs, répondeurs au traitement par IFN expriment plus d'HSP70 dans le noyau et le cytoplasme de leurs hépatocytes que les patients non répondeurs.

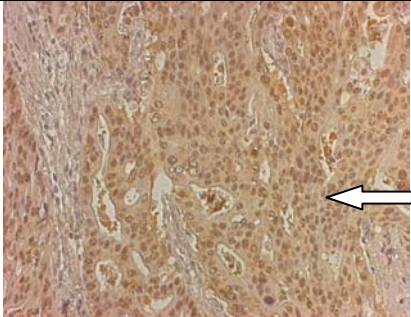
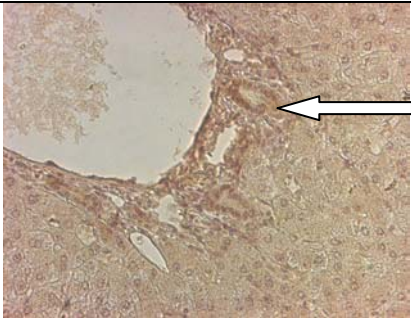
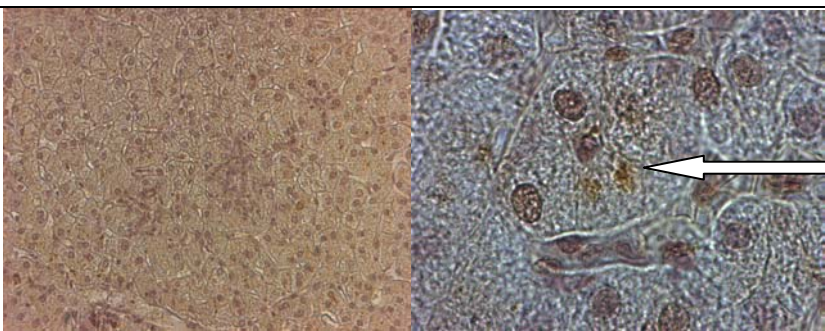
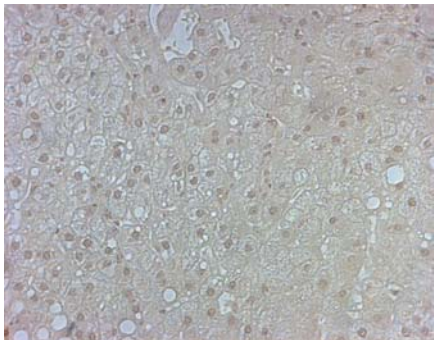
Patients	Intensité du marquage nucléaire	Fréquence des granules cytoplasmiques	Immunomarquage anti-HSP70
Témoin positif (Carcinome gastrique)	+++	0	
Témoin négatif (foie sain)	+ dans les canaux biliaires	0	
VHC répondeur	++	10%	
VHC non répondeur	+	< 5%	

Tableau 10: Caractéristiques immunohistochimiques anti-HSP70 des biopsies. L'intensité du marquage nucléaire est estimée de + (faible) à +++ (forte). Les flèches montrent : 1^{ère} ligne, le marquage des noyaux ; 2^{ème} ligne, le marquage des canaux biliaires ; 3^{ème} ligne, les granules cytoplasmiques

1.2 Détermination de l'antigénémie HSP70 chez les patients VHC.

Les résultats précédents montrent que les tissus hépatiques de certains patients surexprimeraient l'HSP70. Nous allons voulu déterminer si cela était associé à une élévation du taux d'HSP70 circulant dans le sang de ces patients. Nous avons dosé cette antigénémie par méthode sandwich afin d'être le plus sensible possible. L'analyse des résultats et la comparaison des variables quantitatives par un test non paramétrique de Mann Whitney, montrent une élévation statistiquement significative de l'antigénémie HSP70 chez les patients VHC 1 (absorbance : 0,590 +/- 0.229) et VHC AI (absorbance : 0,588 +/- 0.133) par rapport aux témoins négatifs (p= 0,01). Il n'y a pas de différence significative entre les patients lupiques (absorbance : 0.516 +/- 0.084) et les témoins (absorbance : 0,482 +/- 0,074) (p = 0,07). Il n'y a pas de différence significative entre les patients VHC 1 et VHCAI. En prenant comme valeur seuil, la moyenne des témoins plus 2 écarts-types, on voit que 40% des patients VHC AI ont un taux élevé d'HSP70 dans le sang et seulement 27% des patients VHC 1 (fig 11).

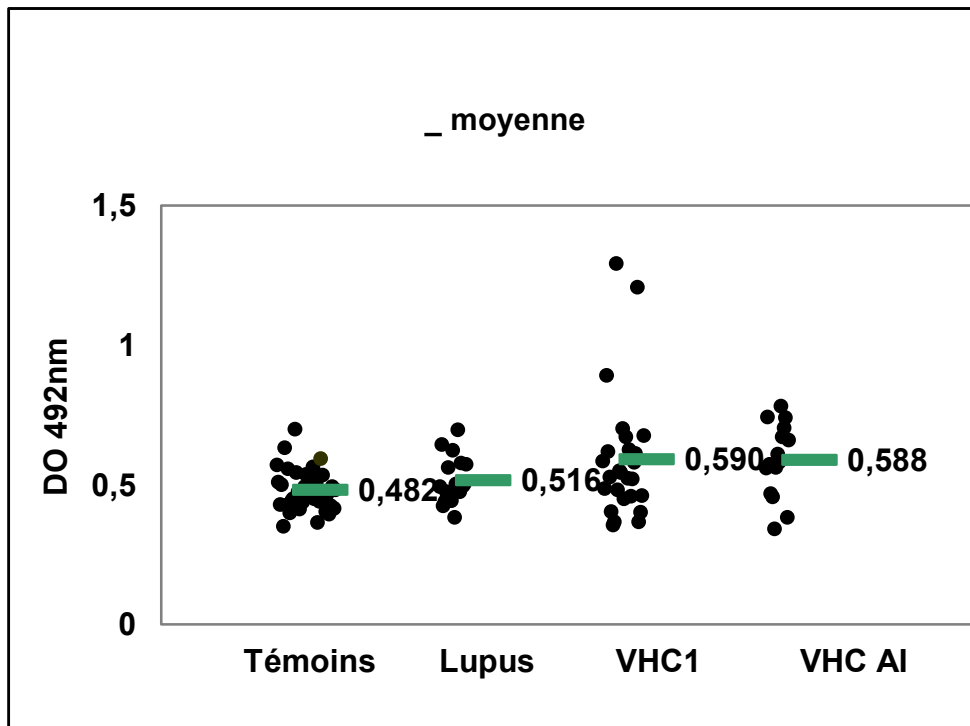


Fig 11: Antigénémie HSP70 chez les différents groupes de patients. La figure exprime les valeurs des absorbances correspondant à HSP70 pour 3 types de patients souffrant de connective (lupus) et d'hépatite C chronique (VHC 1 : sans autoimmunité associée; VHC AI : avec autoimmunité associée).

On note aussi une élévation de l'antigénémie chez les patients lupiques mais plus faible que celle des patients infectés par le VHC (mais différence non statistiquement significative). Seulement 11% des patients lupiques sont au dessus de la valeur seuil.

Il n'existe aucune corrélation entre l'antigénémie HSP70 et les caractéristiques cliniques (génotype, durée de l'infection, âge, sexe, type de maladie auto-immune), et les données biologiques (taux de transaminases, charge virale, auto-anticorps), et les scores Metavir, et la réponse thérapeutique.

1.3 Taux d'anticorps anti HSP chez les différents groupes de patients

Nous avons voulu déterminer si les patients VHC 1 et VHC AI présentaient des anticorps anti-HSP70 et -90. Nous avons donc examinés les réactivités des sérums des différentes populations de patients par test ELISA vis-à-vis des protéines recombinantes.

En prenant pour valeur seuil la moyenne des absorbances des patients témoins plus 2 écarts type, il existe des Ac anti-HSP90 chez 47% et anti-HSP70 chez 41% des patients lupiques.

50% des patients VHC AI ont des Ac anti-HSP90 et 25% des Ac anti-HSP70. Aucun des patients VHC 1 n'exprime des Ac anti-HSP. Les taux d'Ac anti-HSP70 et HSP90 sont statistiquement plus élevés chez les patients VHC AI par rapport aux témoins ($p= 0.05$, HSP70; $p< 0.01$ HSP90) et par rapport aux patients VHC 1 ($p <0.01$, HSP70; $p< 0.001$ HSP90) (test de Wilcoxon) (figures 12 et 13 ; tableau 11).

Nous avons recherché s'il existait une corrélation entre le taux d'anticorps anti-HSP70 et l'antigénémie HSP70 (test de Spearman). Malheureusement, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence.

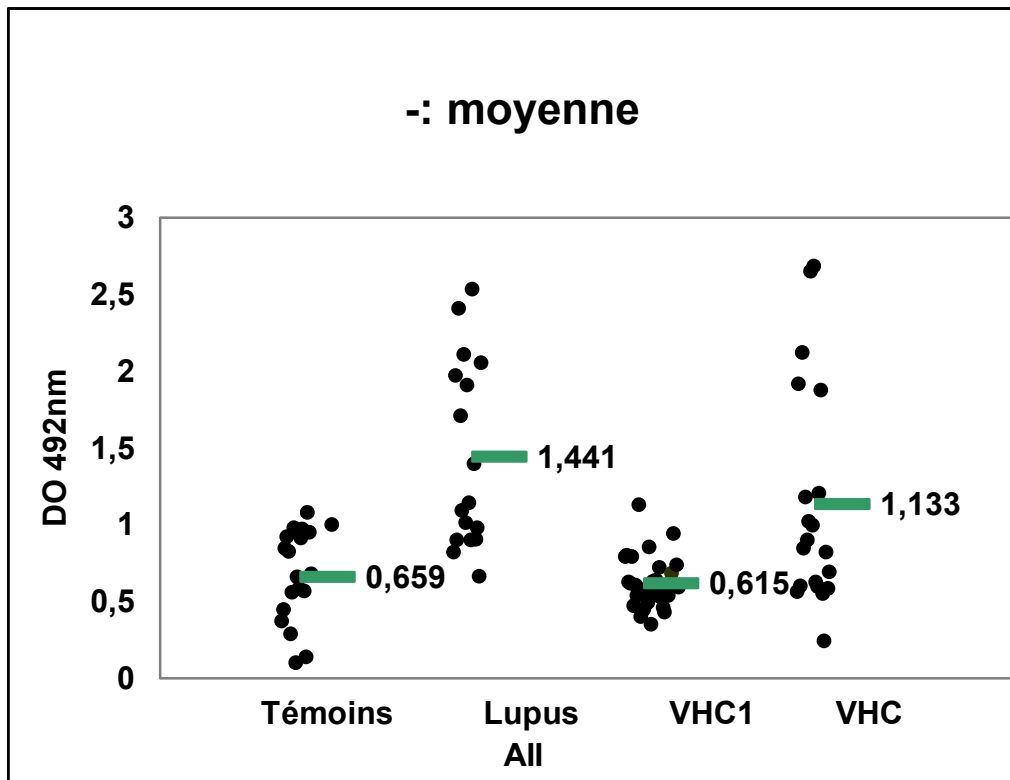


Figure 12: Expression d'autoanticorps anti-HSP70 chez les différents groupes de patients. La figure exprime les valeurs des absorbances correspondant à la réactivité anticorps anti-HSP70 pour 3 types de patients souffrant de connective (lupus) et d'hépatite C chronique (VHC 1 : sans autoimmunité associée; VHC AI : avec autoimmunité associée).

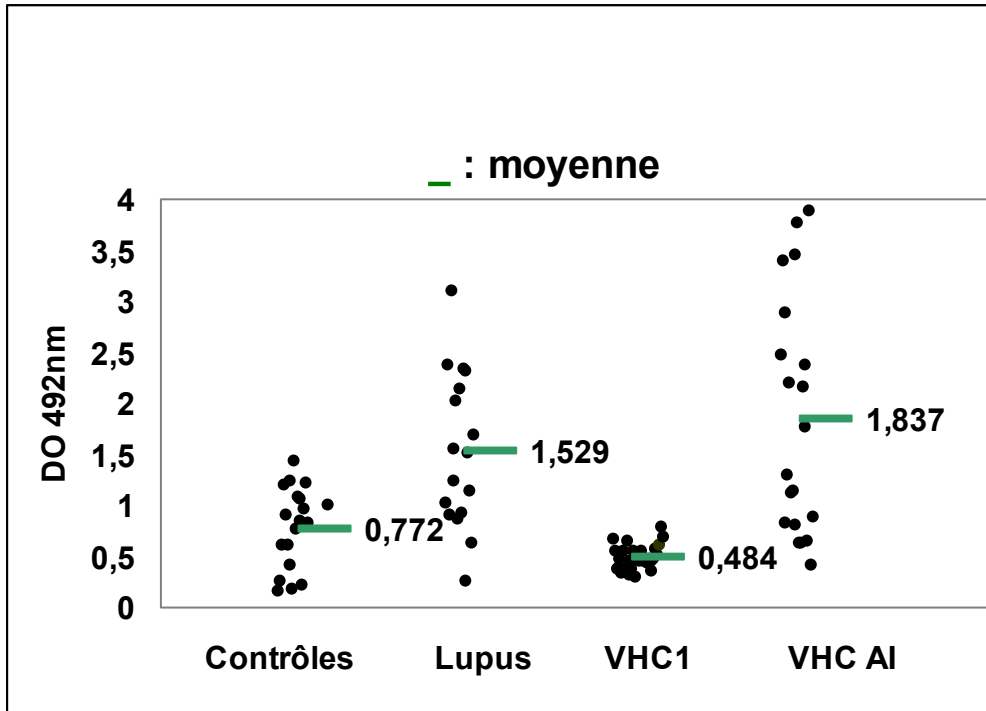


Fig 13 : Expression des autoanticorps anti-HSP90 chez les différents groupes de patients. La figure exprime les valeurs des absorbances correspondant à la réactivité anticorps anti-HSP90 pour 3 types de patients souffrant de connective (lupus) et d'hépatite C chronique (VHC 1 : sans autoimmunité associée; VHC AI : avec autoimmunité associée).

Absorbance (moyenne +/- écart-type)	HSP70	HSP90
Témoins	0,659 +/- 0,300	0,772 +/- 0,403
Lupus	1,441 +/- 0,986	1,529 +/- 0,759
VHC 1	0,615 +/- 0,169	0,484 +/- 0,116
VHC AI	1,133 +/- 0,722	1,837 +/- 1,160

Tableau 11 : Expression des autoanticorps anti-HSP70 et -HSP90 chez les différents groupes de patients. Le tableau décrit les moyennes et écart-types des absorbances des tests ELISA.

Il n'y a aucune corrélation entre le taux d'Ac anti-HSP et le type de maladie auto-immune, ni avec les auto anticorps: ACAN, FR ou cryoglobuline (résultats non montrés).

Dans le groupe VHC, il n'existe aucune corrélation entre le taux d'anticorps anti-HSP70 et 90 et la virémie, ni avec le stade de fibrose (Metavir), ni avec le taux de transaminases (test de Spearman). Il n'y a pas de différence significative entre le groupe des patients VHC répondeurs (absorbance: 0,639±0,199, 1ES) et les patients non répondeurs (absorbance: 0,596±0,139, 1ES) (test de U de Mann Whitney). Nous avons mesuré aussi le taux d'anticorps anti-HSP 70 et 90 sous traitement (1 et 6 mois après le début du traitement). Nous n'avons pas noté de modifications particulières des taux d'anticorps.

Nous avons recherché si la réponse au traitement anti-viral des patients VHC pouvait être en relation avec la présence d'anticorps dirigés contre d'autres protéines chaperonnes de la famille des HSP70 comme la grp78, HSP70 présente dans le RE. Nous avons donc dosé par méthode ELISA, le taux d'anticorps anti-grp78 chez des patients VHC répondeurs, et non répondeurs. En analysant les données (variables quantitatives indépendantes) par un test non paramétrique de Mann Whitney, nous voyons une augmentation du taux d'anticorps anti-grp78 chez les patients répondeurs, mais la différence est à la limite de la significativité statistique ($p = 0,055$) (fig 14). Nous n'avons pas pu doser ces anticorps au cours du traitement.

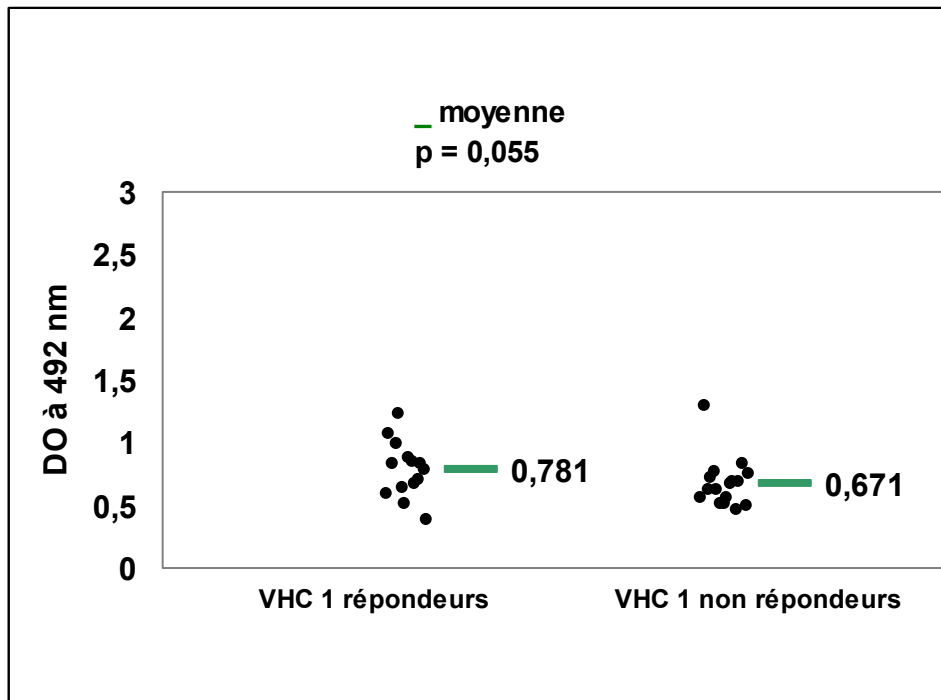


Fig 14: Expression des autoanticorps anti-grp78 chez deux sous-groupes de patients. La figure exprime les valeurs des absorbances relatives, pour la réactivité anticorps anti-grp78 dans un test ELISA. Les sous-groupes de patients sont identifiés pour leur réponse à l'interféron (VHC 1 répondeurs ou non au traitement par interféron).

2. Etude du stress cellulaire induit par le VHC à partir d'un modèle cellulaire HepG2, exprimant la partie N-terminale de la polyprotéine virale.

2.1 Mesure du taux des protéines chaperones dans les lysats HepG2NT et HepG2

Nous avons voulu vérifier si les cellules HepG2 NT exprimant la partie N-terminale du VHC (transfectant stable) synthétisent plus de HSP 70, HSP 90 et de calréticuline que les cellules témoins non stressées (HepG2). Nous avons donc mesuré la quantité d'HSP présente dans les lysats cellulaires par un dosage immunoenzymatique normalisé par rapport aux protéines totales.

Les taux d'HSP70, d'HSP 90, et de la calréticuline sont significativement plus élevés (test de Mann Whitney) dans les lysats HepG2NT que dans les lysats contrôles (HepG2) (fig 15).

La calréticuline est celle dont le taux s'élève le plus.

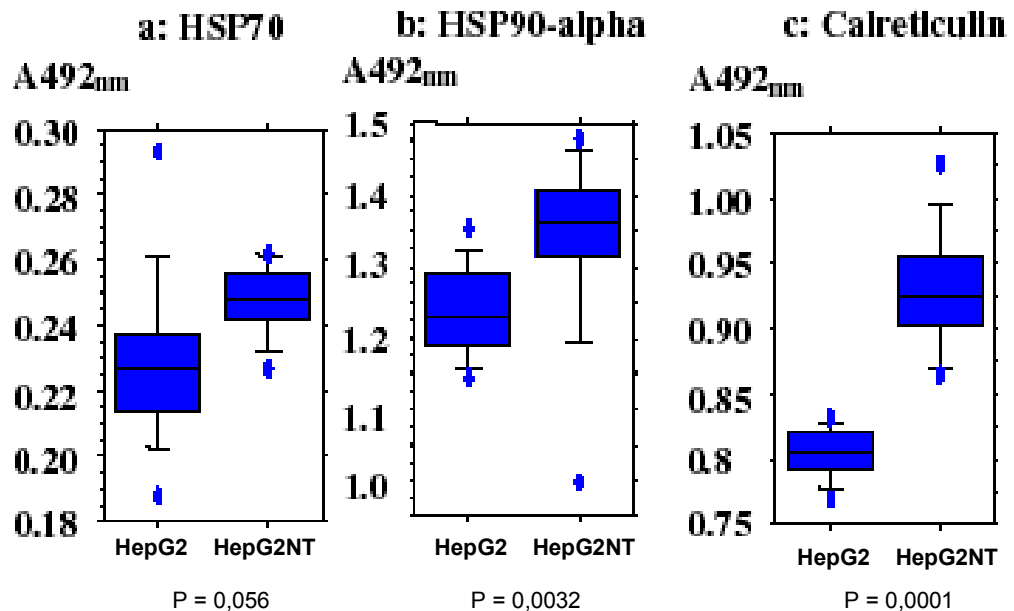


Fig 15 : Taux d'HSP dans les lysats cellulaires. Le taux d'HSP est évalué à partir de tests ELISA, les valeurs d'absorbance ont été normalisées par rapport aux protéines totales pour rendre les mesures comparatives. Les données ont été comparées avec un test de Mann Whitney.

Les résultats ont été confirmés par WB et immunoprécipitation (résultats non montrés).

2.2 Evaluation de la réactivité des sérums des patients VHC 1 vis-à-vis des lysats cellulaires HepG2 NT et HepG2 SW.

Nous avons montré que le stress induit par le VHC induisait l'expression d'HSP dans les cellules. Nous avons voulu déterminer si cela était reconnu par les patients.

Nous avons voulu déterminer si les cellules HepG2NT produisaient des antigènes spécifiques et donc absents des cellules contrôles (HepG2 SW). Nous avons donc testé la réactivité des sérums vis-à-vis de chacun des lysats. Les sérums étaient issus des patients témoins, des patients lupiques, des patients VHC 1 et VHC AI. La réactivité des patients lupiques est statistiquement plus élevée vis-à-vis des lysats HepG2NT que vis-à-vis des lysats contrôles (HepG2 SW) ($p < 0,05$). Chez les patients VHC 1 et VHC AI, on retrouve une réactivité supérieure vis-à-vis des lysats HepG2NT, mais la différence n'est pas significative. Chez les patients témoins, on retrouve le phénomène inverse (fig: 16).

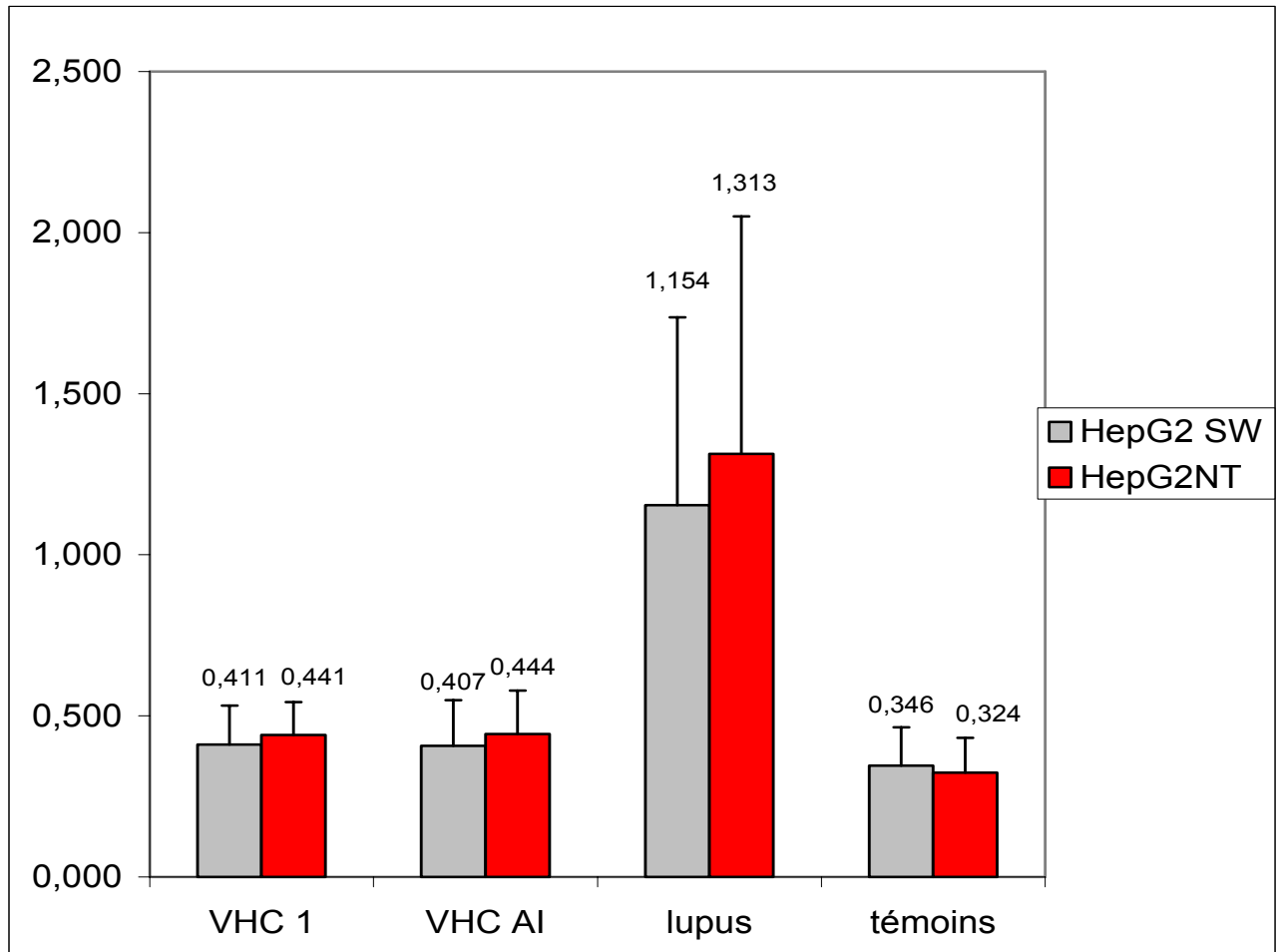


Figure 16: Expression des réactivités anticorps anti-lysats préparés à partir des cellules HepG2. Les tests ELISA (A492 nm) mettent en jeu les échantillons issus des groupes de patients déjà décrits dans les figures précédentes. Les barres d'histogramme représentent les moyennes des absorbances, la ligne verticale la valeur de 1 DS.

Par rapport aux témoins, les patients lupiques expriment un taux significativement plus élevé d'anticorps anti-lysats HepG2NT ($p < 0.0001$). 81% des patients lupiques ont des anticorps anti-lysats HepG2NT (la valeur seuil étant la moyenne plus 2 écarts type des témoins). Les sérums des patients VHC 1 et VHC AI présentent une réactivité supérieure à celle des patients témoins ($p = 0,01$). La réactivité des patients VHC et des patients VHC AI n'est pas statistiquement différente.

2.3 Analyse de la réactivité des sérums des patients VHC 2 (ARC) vis-à-vis des lysats HepG2 et des lysats HepG2NT.

2.3.1 Développement d'anticorps anti-lysats chez les patients VHC 2

Nous voulions vérifier que la réactivité des patients infectés par le VHC vis à vis des lysats HepG2NT n'étaient pas liés à des anticorps dirigés contre les protéines virales mais bien liées à d'autres antigènes. Nous avons donc évalué par tests ELISA, la réactivité des sérums des patients VHC 2 vis-à-vis des lysats HepG2NT (fig 17) et HepG2 (fig 18). Dans les 2 cas, la différence est très significative entre les patients VHC 2 et les témoins ($p = 0.0004$).

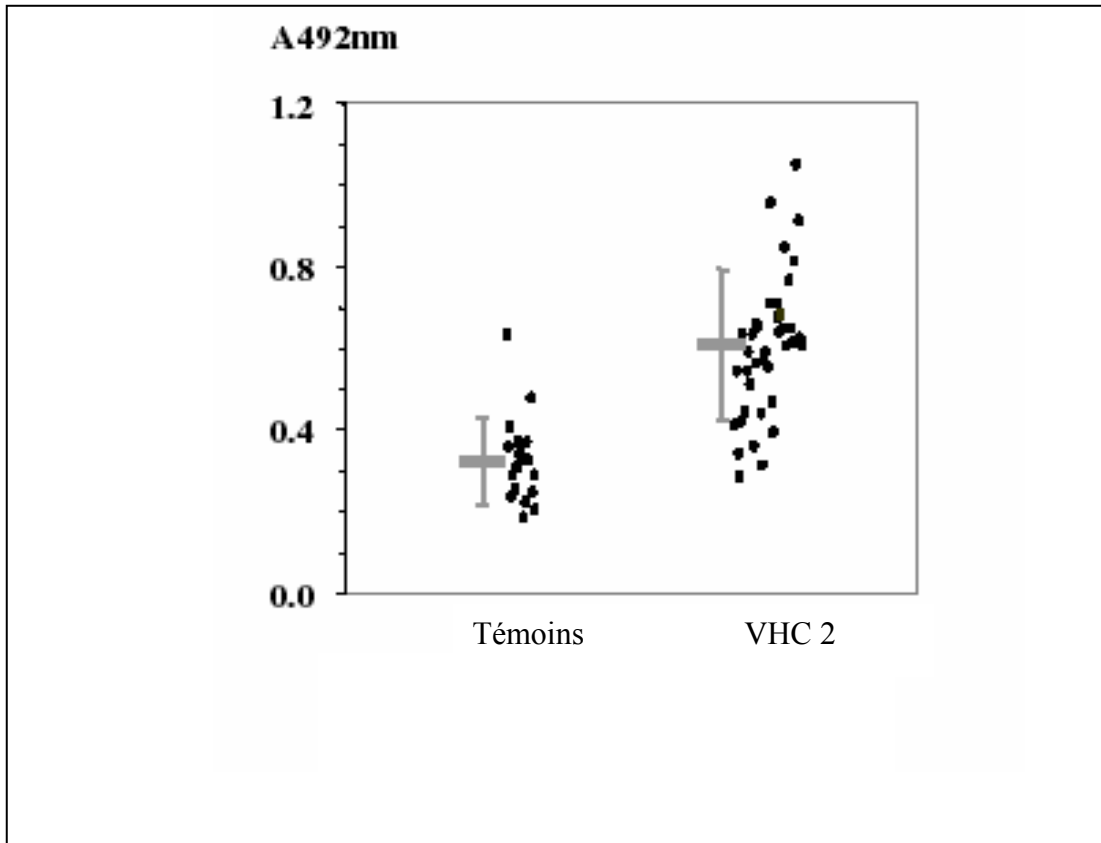


Fig 17: Expression des réactivités anticorps anti-lysate des cellules HepG2NT, des patients VHC 2. Les tests ELISA (A492 nm) mettent en jeu les échantillons issus du groupe de patients VHC 2. Les barres horizontales représentent les moyennes des absorbances, les lignes verticales la valeur de ± 1 DS ($p < 0,0001$).

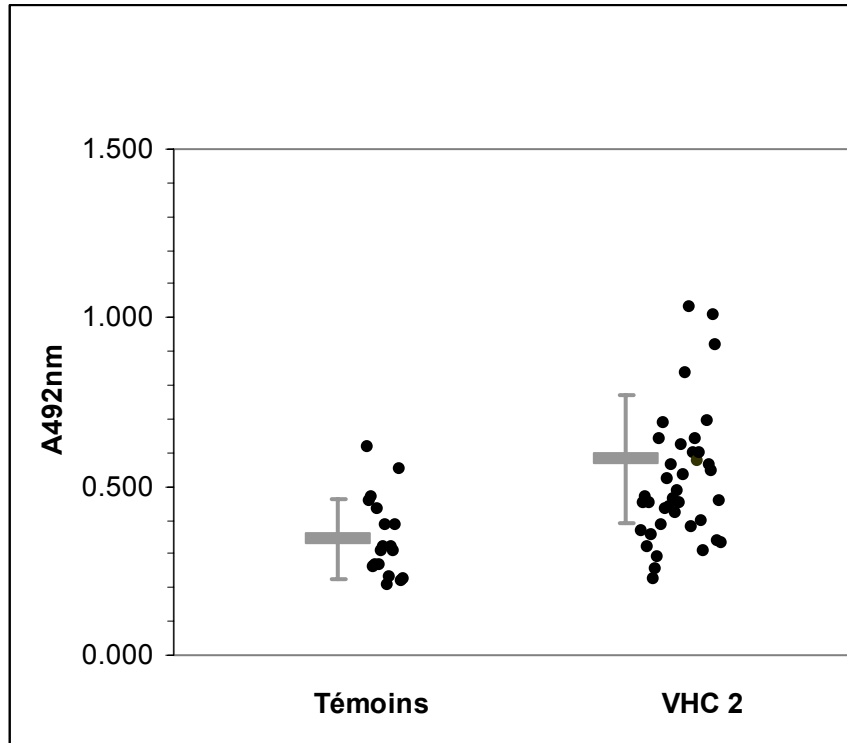


Fig 18: Expression des réactivités anticorps anti-lysate des cellules HepG2, des patients VHC 2. Les tests ELISA (A492 nm) mettent en jeu les échantillons issus du groupe de patients VHC 2. Les barres horizontales représentent les moyennes des absorbances, les lignes verticales la valeur de +/- 1 DS ($p = 0,0004$).

En prenant pour valeur seuil, la moyenne plus 2 écarts type des valeurs des témoins, la prévalence chez les patients VHC 2 des anticorps anti-lysats HepG2NT est de 65 % et des anticorps anti-lysats HepG2 est de 45.8 %. Les patients VHC 2 ont donc des anticorps reconnaissant des Ag présents dans les cellules HepG2NT et HepG2. Cette réactivité n'est pas liée uniquement à la reconnaissance des protéines du VHC mais aussi à la reconnaissance d'antigènes cellulaires présents dans les lysats des cellules non transfectées.

2.3.2 Corrélation entre le taux d'anticorps anti-lysats HepG2NT et les données clinimétriques de l'hépatite C chronique.

A partir des résultats des tests ELISA précédents réalisés sur la population VHC 2 et qui montraient que 65% des patients avaient un anticorps anti-lysate HepG2NT, nous avons recherché des corrélations entre ces résultats et les caractéristiques cliniques, histologiques et thérapeutiques de l'hépatite C chronique.

2.3.2.1 Corrélation entre les résultats des tests ELISA vis-à-vis des lysats HepG2NT et le taux de TGO, l'âge, la virémie, le score METAVIR de fibrose et de l'activité inflammatoire, et le score de Knodell

Chez les patients VHC 2, le taux d'anticorps anti-lysats HepG2NT est corrélé positivement avec le taux de TGO (figure 19), le score Métavir de l'activité inflammatoire, le score de Knodell de la nécrose hépatocytaire péri-portale, et le score de Knodell de l'activité

inflammatoire portale (test de Spearman). Il n'y a pas de corrélation ni avec l'âge, ni avec la virémie, ni avec le score Métavir de fibrose (tableau 12).

	rho	p
Age	0,124	0,446
TGO	0,527	0,0014
Virémie	0,306	0,0632
Métavir Inflammation	0,419	0,018
Métavir fibrose	0,198	0,330
Knodell nécrose	0,431	0,0184
Knodell inflammation	0,450	0,0137

Tableau 12 : Résultats des tests de corrélation (test de rang de Spearman) évalués entre le taux d'anticorps anti-lysats HepG2NT et différents paramètres de l'hépatite C (réalisé avec le logiciel Statview^R).

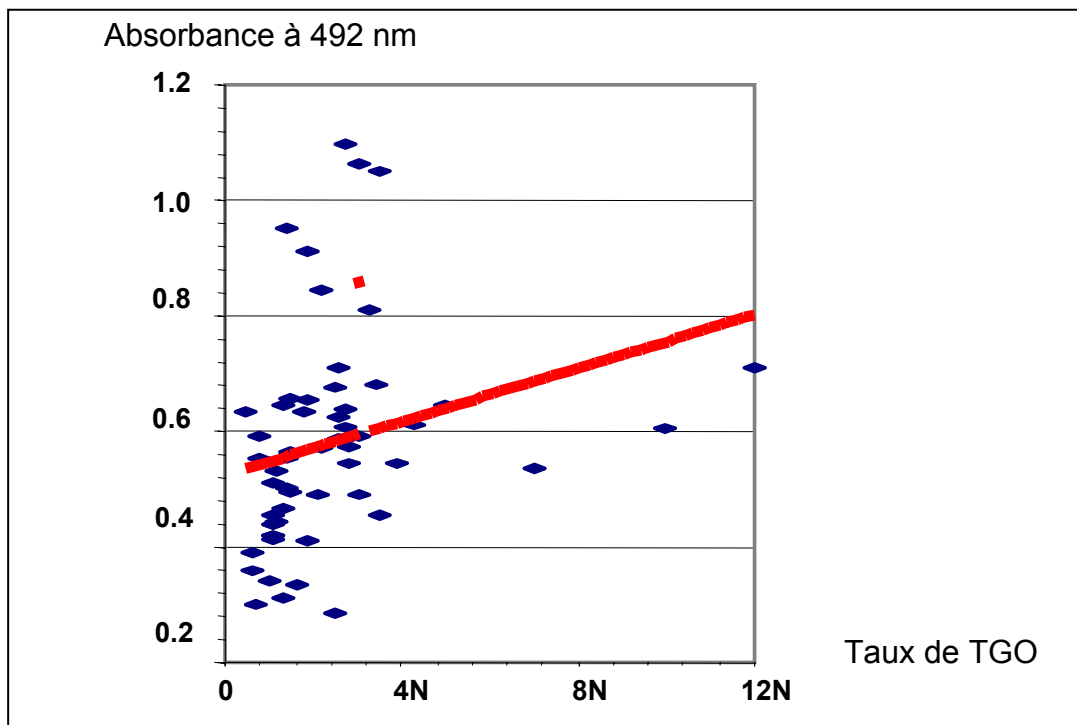


Fig 19: Corrélation entre le taux d'anticorps anti-lysats HepG2NT (Absorbance à 492 nm) et l'activité de TGO (rapporté au taux normal) par test de Spearman (rho = 0,527 ; p = 0,0014).

2.3.2.2 Analyse du taux d'anticorps anti-lysate HepG2NT en fonction de la réponse thérapeutique à l'interféron (IFN) des patients VHC 2.

Nous avons voulu déterminer si la présence d'anticorps anti-lysate HepG2NT chez les patients VHC 2, était associée à une meilleure réponse thérapeutique. Chez les patients VHC 2, 22 patients ont été considérés comme répondeurs (réponse virale soutenue à 6 mois après l'arrêt de l'IFN), les autres étaient non répondeurs. L'analyse des 2 groupes de patients (répondeurs/non répondeurs) montre que le taux d'anticorps anti lysate HepG2NT est significativement plus élevé (fig 20) chez les répondeurs ($p = 0,024$; test de Mann Whitney) que chez les non répondeurs. 77 % des répondeurs ont des anticorps anti-lysate contre seulement 50% des non répondeurs (tableau 12). Les patients ayant des anticorps anti-lysats HepG2NT (26 patients) étaient répondeurs à l'interféron dans 65.4 % des cas alors que seulement 35.7 % des patients sans anticorps anti-lysats (14 patients) l'étaient. Le dosage des Ac anti-lysats HepG2 NT a donc une valeur prédictive positive de la réponse thérapeutique de 65 % (tableau 14).

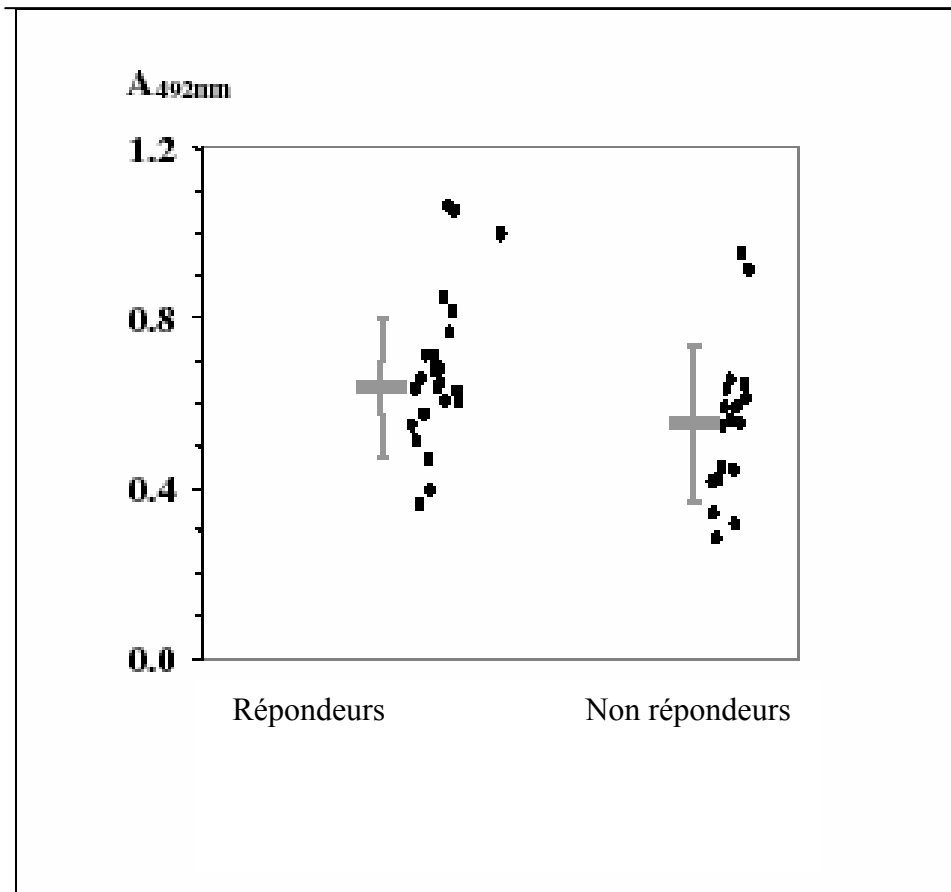


Figure 20: Expression des réactivités anticorps anti-lysate des cellules HepG2NT. Les tests ELISA (A_{492 nm}) mettent en jeu les échantillons des sous-groupes répondeurs et non-répondeurs des patients VHC 2. Les barres horizontales représentent les moyennes des absorbances, les lignes verticales la valeur de +/- 1 DS ($p = 0.024$).

Anticorps anti-lysats HepG2NT	Répondeurs : 22	Non répondeurs : 18	Total
Présence	17 (77%)	9 (50%)	26
Absence	5 (23%)	9 (50%)	14

Tableau 13: Répartition des patients répondeurs et non répondeurs en fonction du taux d'anticorps anti-lysats HepG2NT (valeur seuil définie par la moyenne des valeurs des témoins + 2 écarts-type).

Valeur des anticorps anti- lysats HepG2NT	%
Sensibilité	77
Spécificité	50
Valeur prédictive positive	65
Valeur prédictive négative	64

Tableau 14: Intérêt prédictif des anticorps anti-lysats HepG2NT vis-à-vis de la réponse thérapeutique à l'IFN chez les patients VHC 2.

2.4 Purification des complexes HSP70-peptides à partir des cellules HepG2NT et HepGSW

Les patients VHC présentent donc une réactivité de leur sérum vis-à-vis du contenu cellulaire des cellules HepG2 NT. Nous avons voulu déterminer la cible antigénique de ces anticorps, en utilisant les propriétés de l'HSP70 de se lier à des peptides antigéniques.

Nous avons donc purifié des complexes HSP70-peptides présents dans les cellules HepG2NT pour déterminer si la présence de la partie N-terminale de la polyprotéine virale était associée à l'expression de peptides reconnus et captés par l'HSP70. Nous avons donc purifié ces complexes à partir des cellules HepG2NT et des cellules témoins HepG2SW afin de montrer la possible différence du contenu peptidique entre les 2 phénotypes cellulaires.

Selon la méthode décrite par Srivastava et Ménoret [68,69], nous avons appliqué les mêmes expériences pour les 2 groupes de cellules. 3.5 à 4.0×10^8 cellules ont été cultivées. A partir de ces cellules, nous avons faits des lysats cellulaires qui ont ensuite été traités par chromatographie d'affinité (colonne ADP agarose) qui a la particularité de retenir uniquement les complexes HSP70-peptides. L'HSP70 seule est ATP dépendante.

2.4.1 Première étape : nous réalisons une chromatographie d'affinité ADP agarose à partir des lysats de culture cellulaire HepG2 NT et HepG2SW (fig 21).

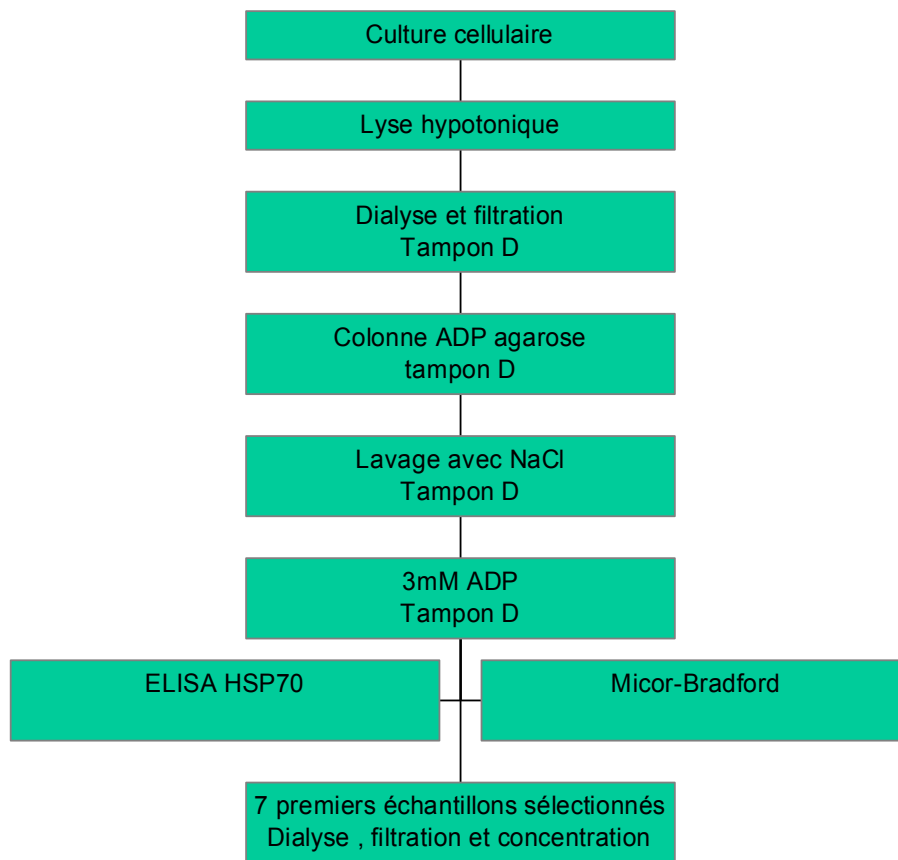


Fig 21 : Schéma opérationnel des premières étapes de la purification des complexes HSP70-peptides

Un pic protéique est élué après le passage du tampon D+ADP (fig 22) ; l'analyse par ELISA HSP70 de ce pic montre qu'il s'agit bien de complexes comprenant de l'HSP70 (fig 23).

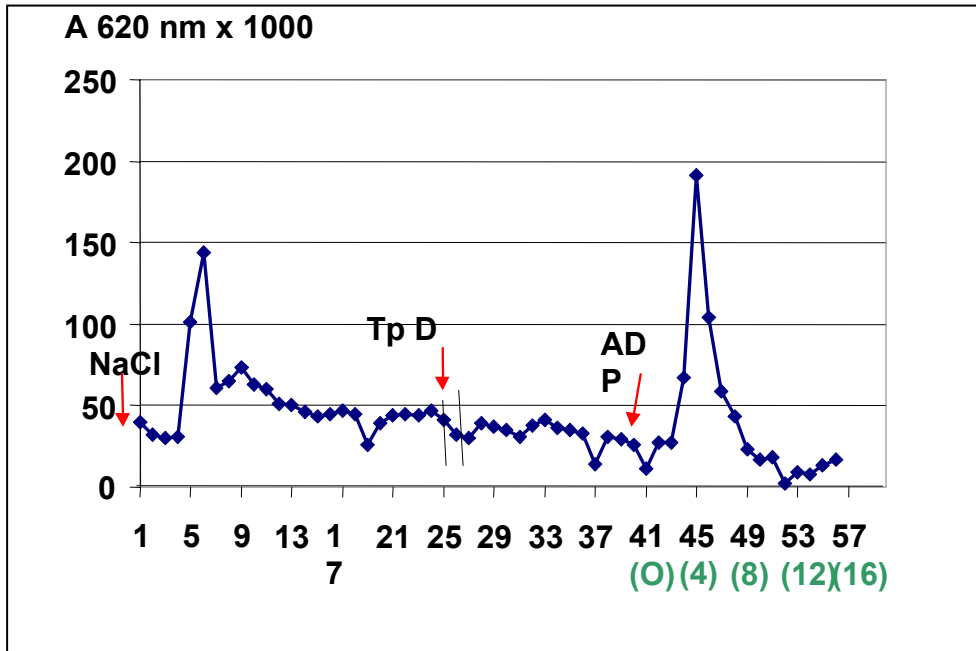


Fig 22: Séparation du lysat HepG2NT par chromatographie d'affinité ADP agarose : Profil d'élution des protéines. Les échantillons ont été soumis au dosage des protéines par microbradford. Les fractions 41 à 57 après le passage du tampon D plus ADP ont été aussi analysées par ELISA anti-HSP70.

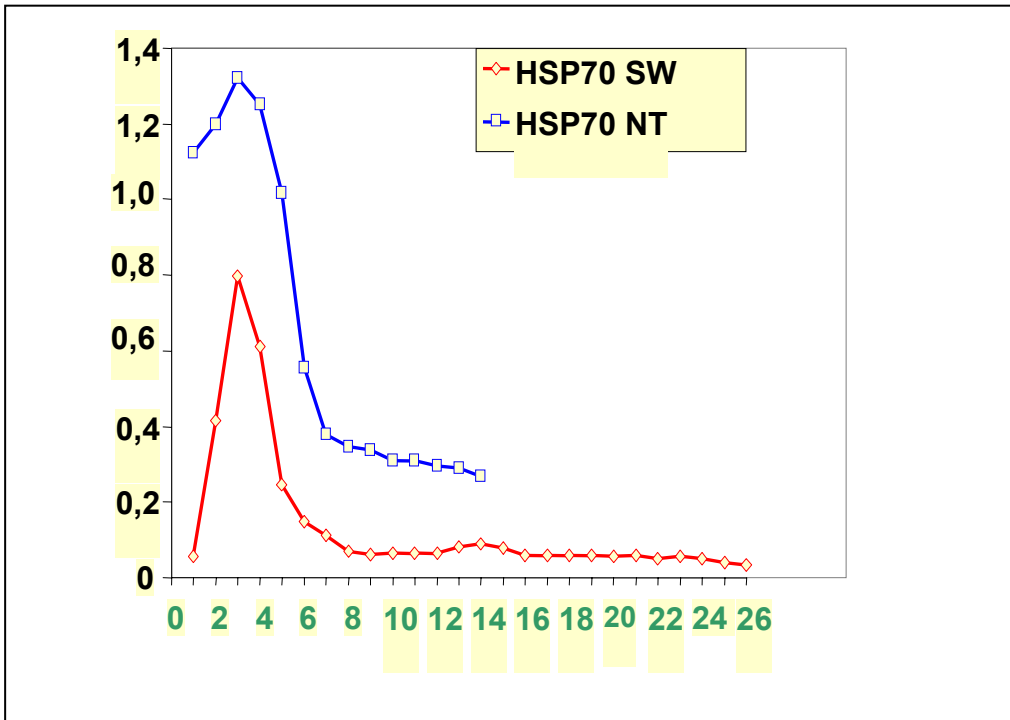


Fig 23: Séparation des lysats HepG2NT et HSP70SW par chromatographie d'affinité ADP agarose : examen des fractions pour leur contenu en HSP70. Les fractions sont collectées après élution avec le tampon D plus ADP (fractions 41 à 57, renommées 1 à 16).

2.4.2 Deuxième étape: les échantillons 1 à 8 (retenus par leur contenu en HSP70) sont ensuite soumis à une chromatographie d'échange d'ions mono Q (HPLC) (fig 24).

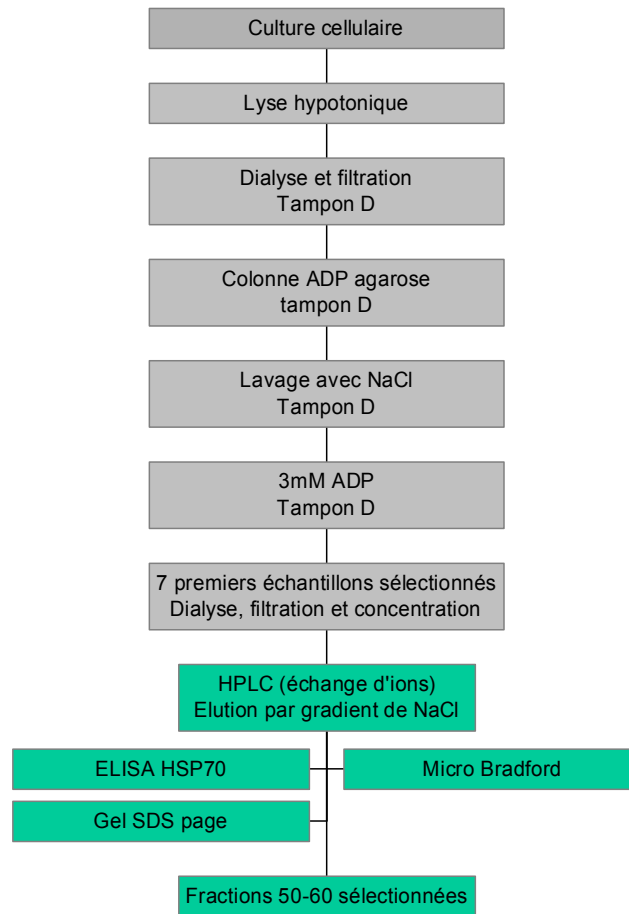


Fig 24 : Schéma opérationnel des étapes de la purification des complexes HSP70-peptides : chromatographie HPLC Mono Q à laquelle ont été soumis les échantillons 1 à 8.

Les fractions sélectionnées précédemment sont déposées sur une colonne mono Q, échangeuse d'ions. On réalise une élution par gradient de NaCl. Les fractions éluées sont analysées par ELISA HSP70 (fig 25). Les fractions sélectionnées pour leur contenu en HSP70 (fractions 50 à 60) sont poolées et analysées par gel SDS-PAGE (fig 26). Sur le gel, en regard de la piste 3 (lysate HepG2NT), est mise en évidence une bande unique et importante, de Mr de 70 000 kDa, correspondant à la Mr attendue pour les complexes HSP70-peptides. Cette bande est plus importante que celle retrouvée sur la piste témoin (μ g d'HSP70 recombinante) et sur la piste 6 (lysate témoin HepG2SW).

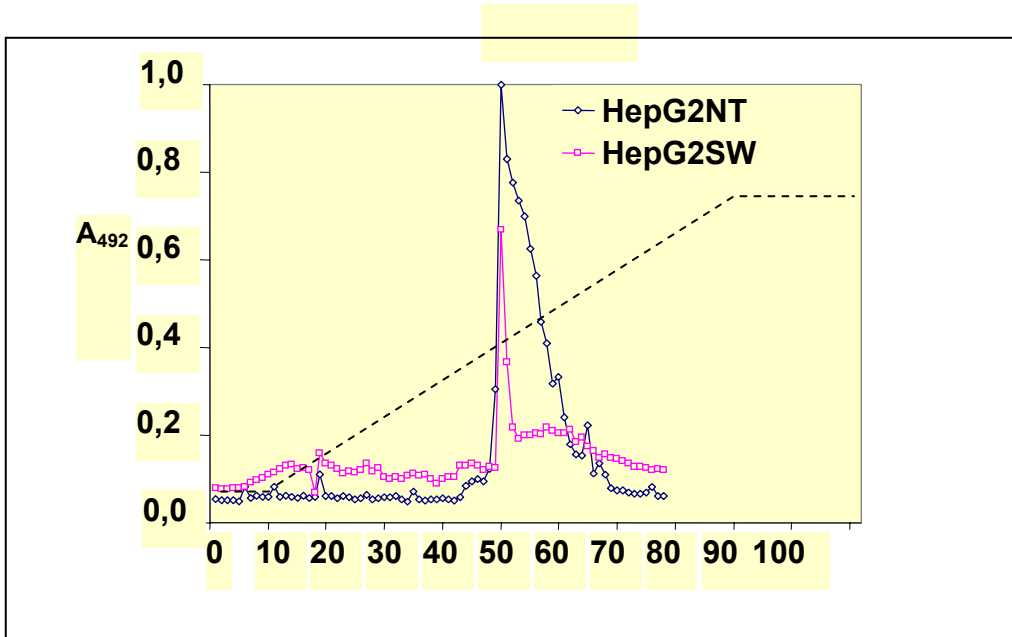
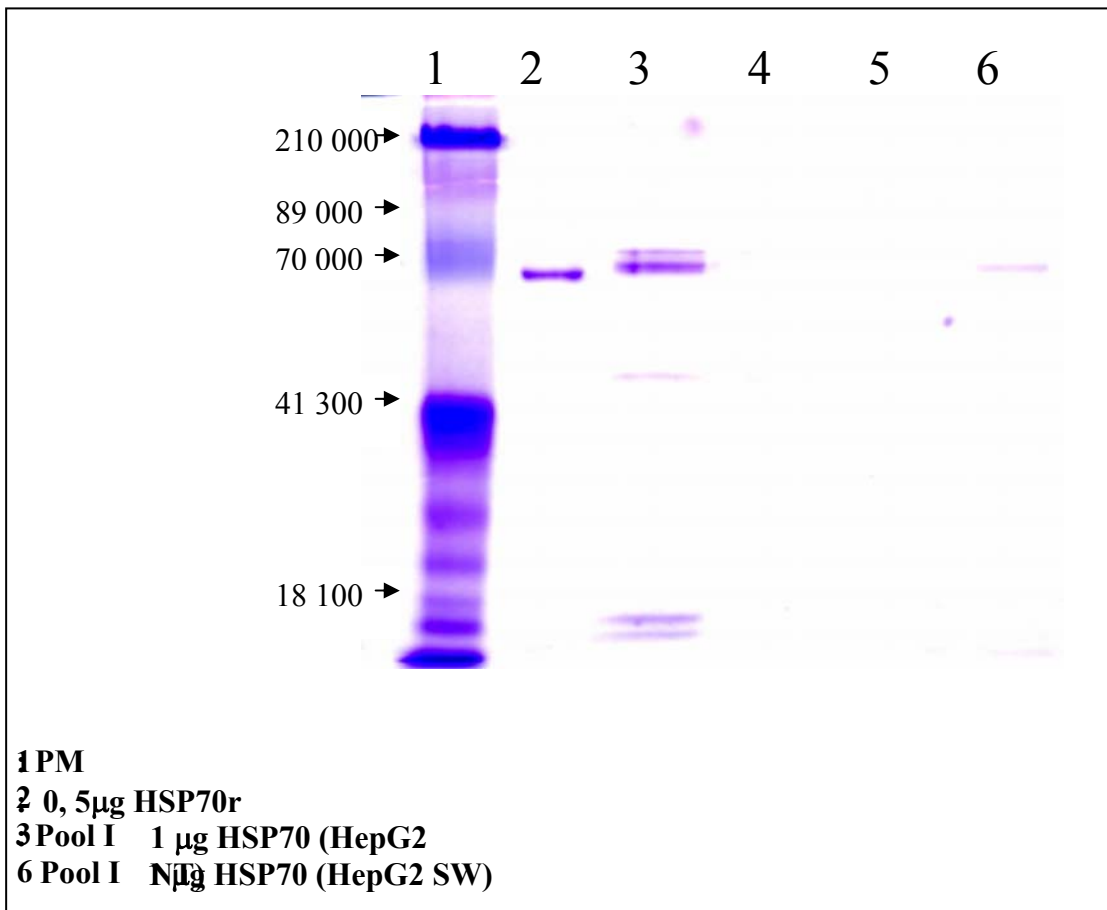


Fig 25: Séparation des lysats HepG2NT et HSP70SW par chromatographie HPLC : examen des fractions pour leur contenu en HSP70. Les fractions sont collectées après élution avec le tampon D plus ADP (fractions 41 à 57, renommées 1 à 16). Les mesures ont été faites par le test ELISA (A492 nm). Le pointillé représente le gradient de NaCl..

Fig 26 : Analyse par électrophorèse (gel SDS-PAGE) du pool I (fractions 50 à 60) issu des lysats HepG2NT. Référence protéine HSP10 recombinante (piste 2).



2.4.3 Evaluation de la purification des complexes HSP70-peptides : rendement et coefficient de purification.

Nous avons évalué la purification des complexes HSP70 grâce au coefficient de purification définie par la relation entre l'activité ELISA anti HSP70, et la concentration des protéines totales déterminée par microbradford à chaque étape du processus (tableau 15). A partir de 4×10^8 cellules HepG2NT ou HepG2SW, on obtient 143 μg de complexes HSP70-peptides pour les cellules HepG2NT (0,36 picogramme (pg)/cellule) et 113 μg de complexes HSP70-peptides pour les cellules HepG2SW (0,28 pg/cellule). Nous obtenons un coefficient de purification de 12 à la fin de la purification contre 0,1 au début de l'analyse (fig 27). Ainsi nous obtenons un rendement de l'ordre du picogramme de complexes HSP70 par cellule avec un degré de pureté 120 fois supérieur.

Culot HepG2NT = 40 ml	Numéro d'étape	Concentration protéique totale en $\mu\text{g}/\text{ml}$	Volume total en ml	Quantité protéique en μg	% estimé de complexes
après l'homogénéisation	1	1325,94	30	39 778,20	0,36%
après l'ultra concentration	2	1226,46	25	30 661,50	0,47%
après la 1 ^{ère} dialyse	3	1192,96	25	29 824	0,48%
après la filtration	4	1106,04	20	22 120,80	0,65%
après la colonne ADP agarose	5	18,06	10,5	189,63	75,59%
Après la 2 ^{ème} dialyse	6	< 20	10	< 200	75,59%
après l'HPLC	7	40	4,4	176	81,45%
Après la concentration	8	1433,5	0,1	143,35	100%

Tableau 15 : Tableau de purification des associations HSP70 à partir du lysat HepG2NT.

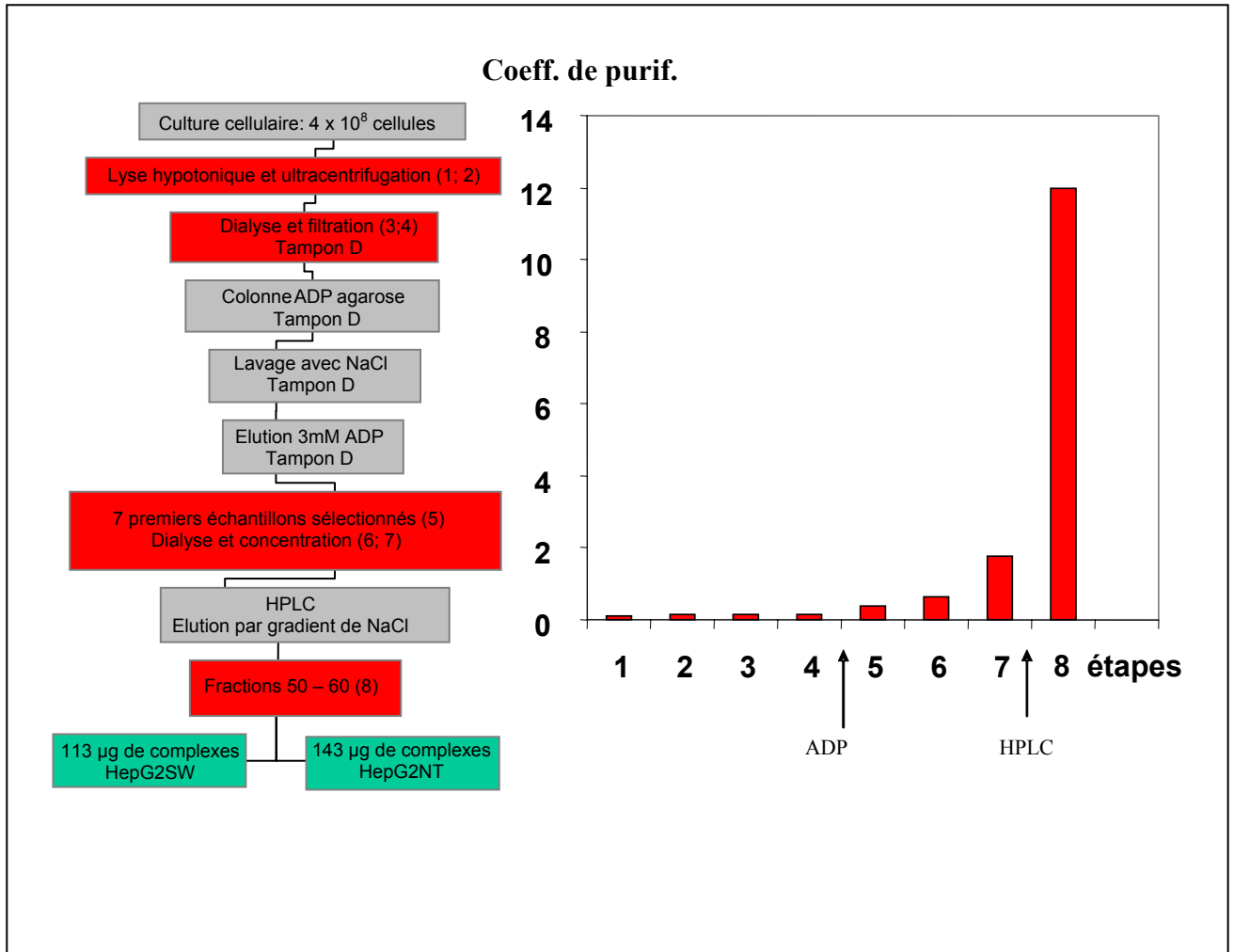
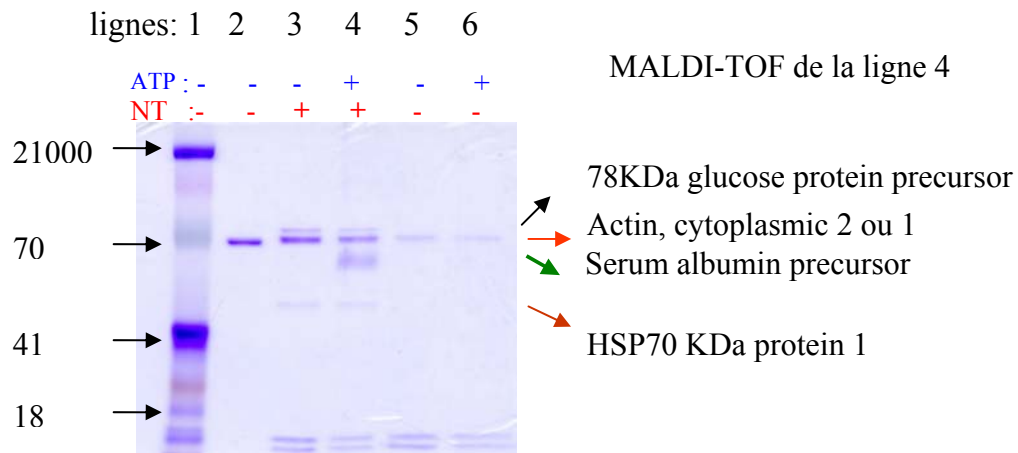


Fig 27 : Etapes et rendement de la purification. Les coefficients de purification des complexes HSP70-peptides provenant des cellules HepG2NT sont exprimés sur les ordonnées; en abscisse sont indiqués les différentes étapes de purification indiquées sur l'organigramme.

2.5 Séparation des complexes HSP70-peptides

Les échantillons obtenus précédemment, et retenus pour leur contenu en complexes, sont incubés 1h avec de l'ATP 10 mM, pour assurer la libération des peptides par l'HSP70. A l'issue de cette incubation, les préparations sont analysées par un gel SDS-PAGE (fig 28). L'incubation avec l'ATP diminue l'intensité des 2 bandes de 70 000 Mr et de 78 000 Mr, correspondant aux protéines HSP70 (piste 4). Pour préciser la nature des espèces moléculaires, Les bandes ont été analysées par MALDI-TOF (L.Kuhn, J.Garin, CEA). L'observation des masses et les séquence peptidiques obtenues par séquençage N-terminal, montrent la présence d'HSP70 et de la gp78 (fig 28).



- 1 : PM
- 2 : 0,5 µg d'HSP70 recombinante
- 3 : Pool I: 1 µg decomplexes HSP70 (HepG2 NT)
- 4 : Pool I: 1 µg decomplexes HSP70 (HepG2 NT) + 10mMATP + 3mM MgCl₂
- 5 : Pool I: 1µg de complexes HSP70 (HepG2 SW)
- 6 : Pool I: 1 µg de complexes HSP70 (HepG2 SW) + 10mMATP + 3mM MgCl₂

Fig 28: Analyse par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE des échantillons en présence et en absence d'ATP. Référence protéine HSP10 recombinante (piste 2).

2.6 Identification des peptides associés à l'HSP70

Après avoir libéré les peptides des complexes, la question se pose de les identifier. Pour cela, nous avons isolé les peptides de petit poids moléculaire grâce à une ultrafiltration (système Centricon YM10® ; cut off 10 000 Da). Nous avons ensuite séparé les peptides par chromatographie HPLC sur une colonne phase inverse (colonne C18) (fig 29).

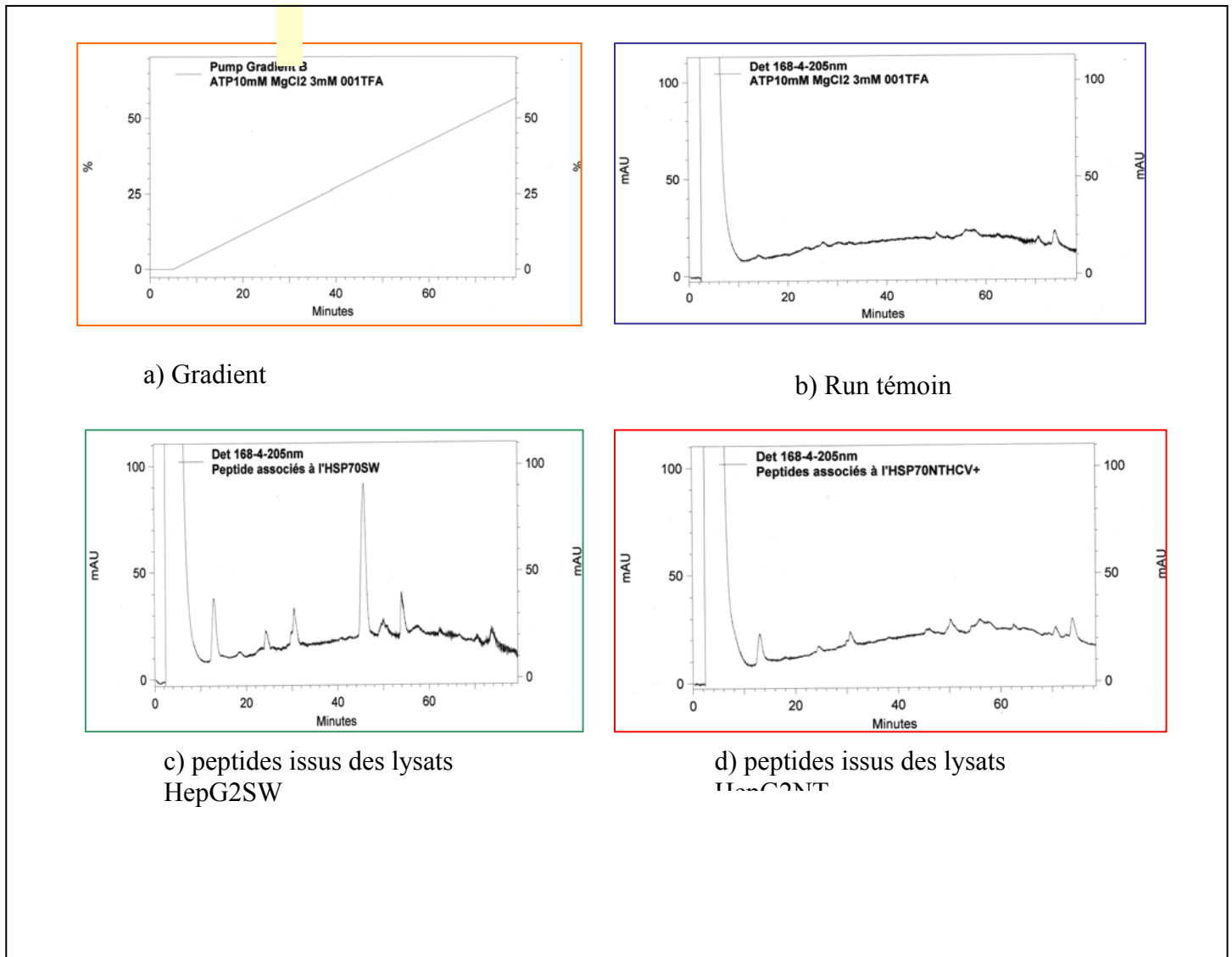


Fig 29 : Chromatographie HPLC phase inverse sur matrice C18 des peptides issus des complexes HSP70-peptides.

Les échantillons obtenus après cette chromatographie sont poolés : pool 1 (5-10 min), pool 2 (13-19 min), pool 3 (22-31 min), pool 4 (35-48 min). Toutes les manipulations ont été réalisées en parallèle pour les lysats HepG2NT et HepG2SW, afin de pouvoir comparer les profils des peptides ainsi séparés.

2.6.1 Analyse des masses par MALDI-TOF des pools peptidiques issus des lysats HepG2NT et HepG2SW

L'hypothèse princeps repose sur la responsabilité de la partie N-terminale du VHC dans les cellules HepG2 à créer des perturbations protéiques induisant l'apparition de peptides reconnus et captés par l'HSP70. Ces peptides seraient absentes ou en quantité minimale dans les lysats sans la partie N-terminale de la polyprotéine virale. Après avoir purifié les complexes HSP70-peptides, puis isolé les peptides, nous voulons maintenant les identifier par la masse et comparer les profils selon les souches cellulaires avec ou sans la partie N-terminale de la polyprotéine virale.

Les peptides des 4 pools sont analysés par MALDI-TOF (B.Dublet, E.Forest, IBS).

Les pools 1, 2, et 4 montrent un profil peptidique identique pour HepG2NT et HepG2SW (fig 30-c).

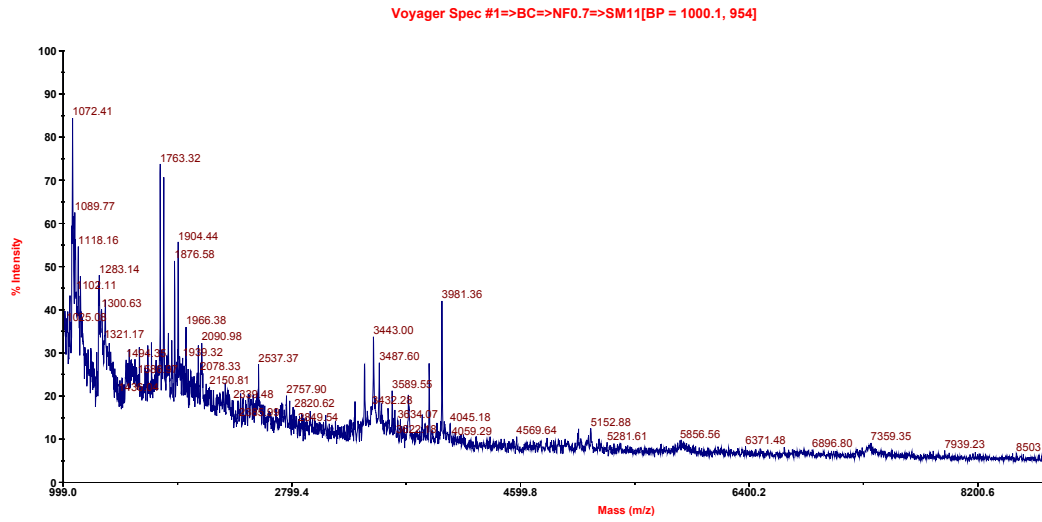
Par contre, le pool 3 des cellules HepG2NT présente un profil différent de celui des cellules HepG2SW (fig 30-b). Il apparaît plusieurs pics identifiés par la masse qui sont absents du pool 3 témoin (fig 30-a).

On note 8 spectres correspondant à des espèces moléculaires de 1 000 à 4000 Da (tableau 16).

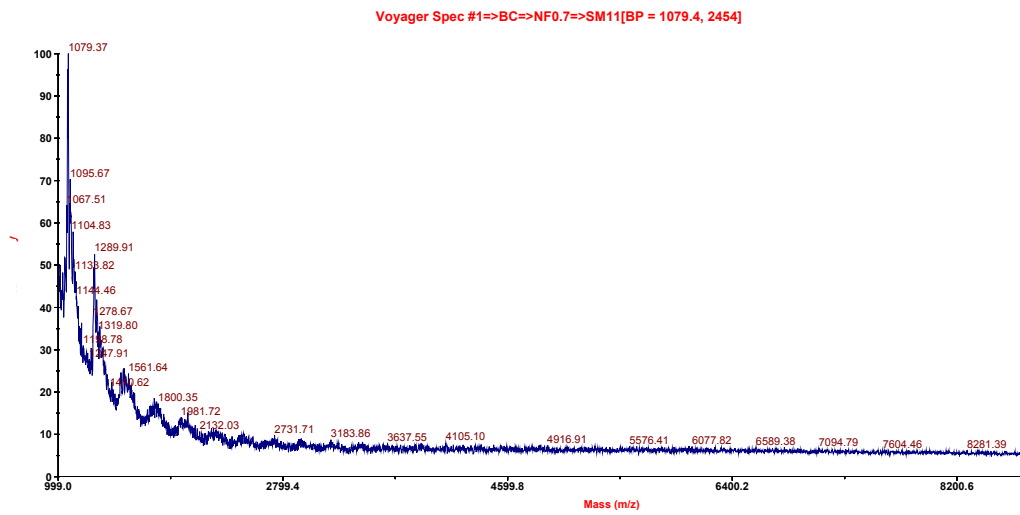
Numéro	Peptides (m/z)
1	3981
2	3880
3	3487
4	3443
5	1904
6	1876
7	1791
8	1763

Tableau 16 : Masse des peptides (m/z) du pool 3. L'estimation est faite d'après le spectre de masse (MALDI-TOF, figure 30).

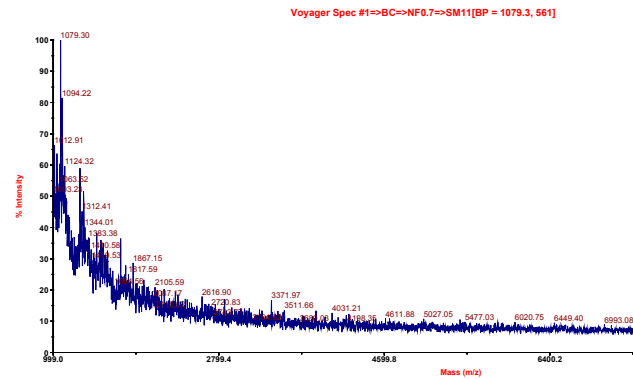
a) Pool 3 HepG2NT



b) Pool 3 HepG2SW



c) Pools 1, 2, 4 HepG2NT et HepG2SW



m/z

Fig 30: Spectres MALDI-TOF des espèces moléculaires éluées des complexes HSP70-peptides provenant de la purification des lysats cellulaires HepG2NT et HepG2NSW (pools 1, 2, 3 et 4).

2.6.2 Analyse du pool 3 par MALDI-TOF LC-MS/MS

Les peptides issus des pools 3 ont été soumis à une chromatographie HPLC phase inverse C18. Une nouvelle analyse par MALDI-TOF LC-MS/MS (L.Kuhn, J.Garin, CEA) a confirmé la présence de peptides dans les lysats HepG2NT et absents des lysats HepG2SW (fig 31 ; tableau 17).

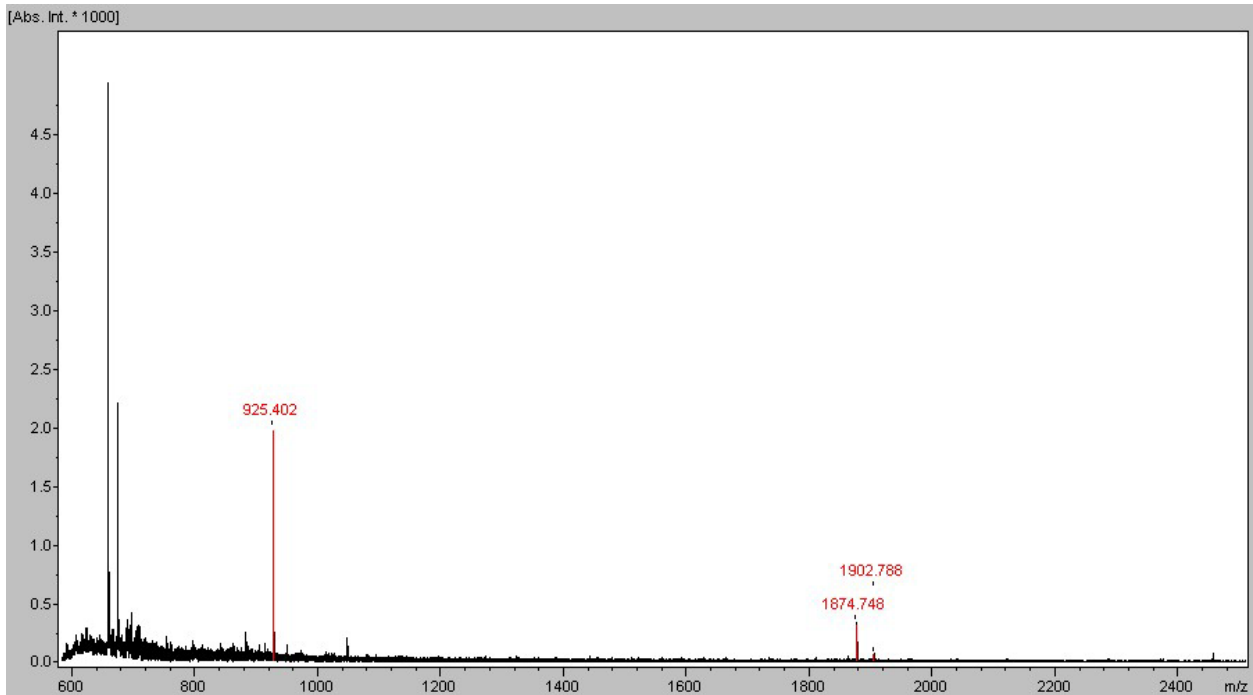


Fig 31: Spectre de masse de type MALDI-TOF LC-MS/MS de la fraction 9 du pool 3 issu des cellules HepG2NT. Les masses sont identifiées en référence aux étalons. 3 espèces moléculaires (tableau 15) ne sont pas retrouvées dans le spectre de la fraction correspondante issue des cellules HepG2SW.

On retrouve les pics 5 et 6 de masse respective 1903 Da et 1875 Da (tableau 14) et un plus petit de masse 924 Da (tableau 17).

Numéro	Peptides (m/z)
5	1903
6	1875
9	925

Tableau 17 : Masse des peptides (m/z) du pool 3 retenues pour n'appartenir qu'au lysat HepG2NT. L'estimation est faite d'après le spectre de masse (MALDI-TOF LC-MS/MS, figure 31)

2.6.3 Identification par séquençage des peptides associés à l'HSP70.

Les peptides isolés dans la fraction 9 du pool 3 HepG2NT ont été analysés par LC-MS/MS (L.Kuhn, J.Garin, CEA). Le séquençage a permis de retenir 2 séquences.

A	S	H	M	T	A	A
A	S	H	N	F	P	

La comparaison de ces séquences avec celles des banques de données protéiques (NCBI) n'a pas permis de mettre en évidence une similitude, avec les séquences des protéines virales de la partie N-terminale de HCV (protéines structurales, NS2 et NS3), ou avec celles de protéines cellulaires inventoriées. Par contre, la 2^{ème} séquence présente une homologie de 100% avec « la protéine hypothétique humaine » (303 AA) (gi/89038700/ref/XP-937607), qui n'a pas de fonction connue.

3. Mise en évidence d'un potentiel protéolytique de NS3 vis-à-vis de protéines cellulaires

L'émergence de peptides, reconnus par HSP70, dans les cellules transfectées avec la partie N-terminale de la polyprotéine virale, pourrait être secondaire à l'activité sérine protéase de NS3, enzyme clé de la réplication virale. Nous avons voulu vérifier si NS3 pouvait interagir avec certaines protéines cellulaires : C1Inh (SERPIN qui pourrait exercer de plus un contrôle sur NS3), et le CYP450 2D6 (protéine clé dont certains épitopes sont impliqués dans les hépatites auto-immunes associées au VHC). Le développement d'une liaison covalente signifierait le contrôle possible de NS3 par la serpin.

3.1 Interaction entre NS3 et C1Inh

3.1.1 Interaction extra-cellulaire entre NS3 et C1Inh

NS3 recombinante a été produite par *E.Coli* et purifiée par une colonne d'affinité NiNTA. Sa fonction a été éprouvée vis-à-vis de son substrat viral NS5. Nous avons incubé NS3 et C1Inh dans des conditions de concentrations croissantes de NS3. Les échantillons ont été séparés sur un gel SDS-PAGE et soumis à un immunoblot anti-C1Inh (fig 32). En présence de la protéine virale NS3, C1Inh est coupé (piste 2) et forme des complexes de haut poids moléculaire (pistes 2, 3, 4) qui pourrait être représentatifs de complexes inhibiteurs C1Inh-NS3.

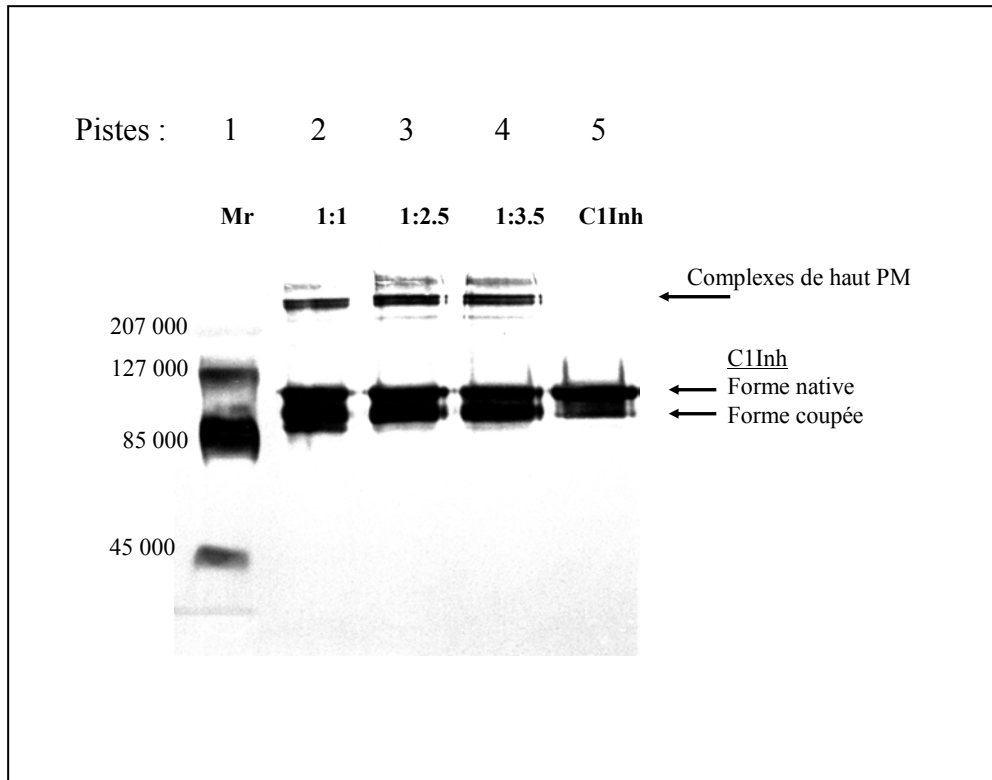


Fig 32: Analyse par gel SDS-PAGE 7.5% et Immunoblot anti-C1Inh de l'incubation de C1inh avec des quantités croissantes de NS3. Mise en évidence d'une coupure de C1Inh et de complexes.

Piste 1 : marqueur de poids moléculaire

Piste 2 : concentration équimolaire de C1Inh et de NS3

Piste 3 : C1Inh / NS3 = 1 / 2,5

Piste 4 : C1Inh / NS3 = 1 / 3,5

Piste 5 : C1Inh purifié

La protéine NS3 est préincubée avec des inhibiteurs de serine protéases (DFP, TLCK, et TPCK), puis mise en présence de C1Inh. Les échantillons sont ensuite analysés sur un gel SDS-PAGE et par Immunoblot anti-C1Inh (fig 33). Les pistes 2, 4 et 6 montrent que la coupure de C1Inh est moins importante que dans le cas de la piste 1. La coupure de C1Inh par NS3 est bloquée par les inhibiteurs à serine protéases.

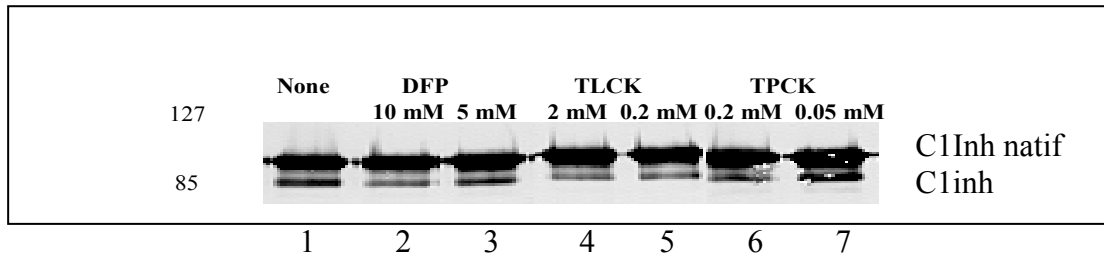


Fig 33: Immunoblot anti-C1Inh (SDS-PAGE 7.5%). Incubation de C1Inh avec NS3 préalablement incubée avec le DFP (pistes 2-3), TLCK (pistes 4-5), TPCK (pistes 6-7).

Nous avons voulu déterminer si les complexes de haut poids moléculaires étaient bien associés par liaison ester entre les protéines serpin et protéase. Nous avons donc traité les échantillons issus de l'incubation de C1Inh et NS3, par l'hydroxylamine, réactif nucléophile doué de la propriété de rompre uniquement les liaisons esters. L'analyse des échantillons par gel SDS-PAGE puis immunoblot anti-C1Inh montre que l'hydroxylamine fait disparaître les complexes de haut poids moléculaire (fig 34) de la même manière que les complexes C1Inh-C1s (pistes 3 et 6). Il s'agit donc bien d'une liaison covalente de type ester. Nous avons les mêmes résultats avec une autre serpin : l' $\alpha 2$ antiplasmine (résultats non montrés).

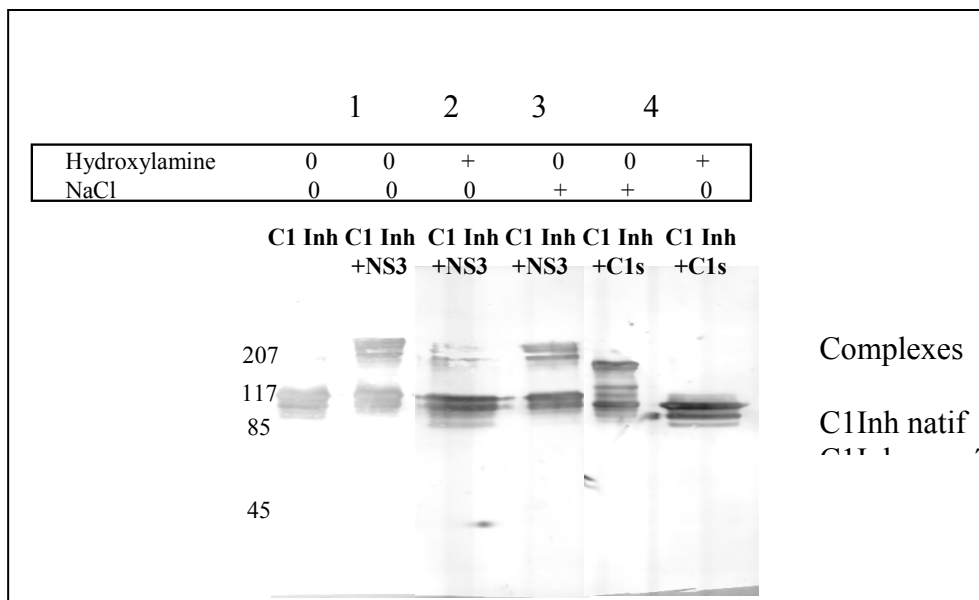


Fig 34: Immunoblot anti-C1Inh (SDS-PAGE 7.5%) de l'incubation de C1Inh avec NS3 et la protéase C1s ; les pistes 3, 4 et 6 sont représentatives du traitement par l'hydroxylamine des échantillons.

3.1.2 Interaction intracellulaire entre NS3 et C1Inh

Nous avons voulu vérifier que NS3 et C1Inh pouvaient interagir au cours de la biosynthèse cellulaire et que NS3 et C1Inh pouvaient former des complexes, observés *in vitro*. Des cellules HepG2NT sont donc transfectées avec le minigène de C1Inh «taggé histidine». Les cellules sont marquées au ^{35}S et les lysats HepG2 NT, sont soumis à une immunoprécipitation par les anticorps anti-C1Inh ou anti-NS3. Dès la 30^e min, on met en évidence une petite quantité de complexes de hauts poids moléculaires reconnus par les anticorps antiC1Inh et anti-NS3. Il y a donc interaction pendant les 30 premières minutes entre NS3 et C1Inh, avec une cinétique de formation de complexes (fig 35).

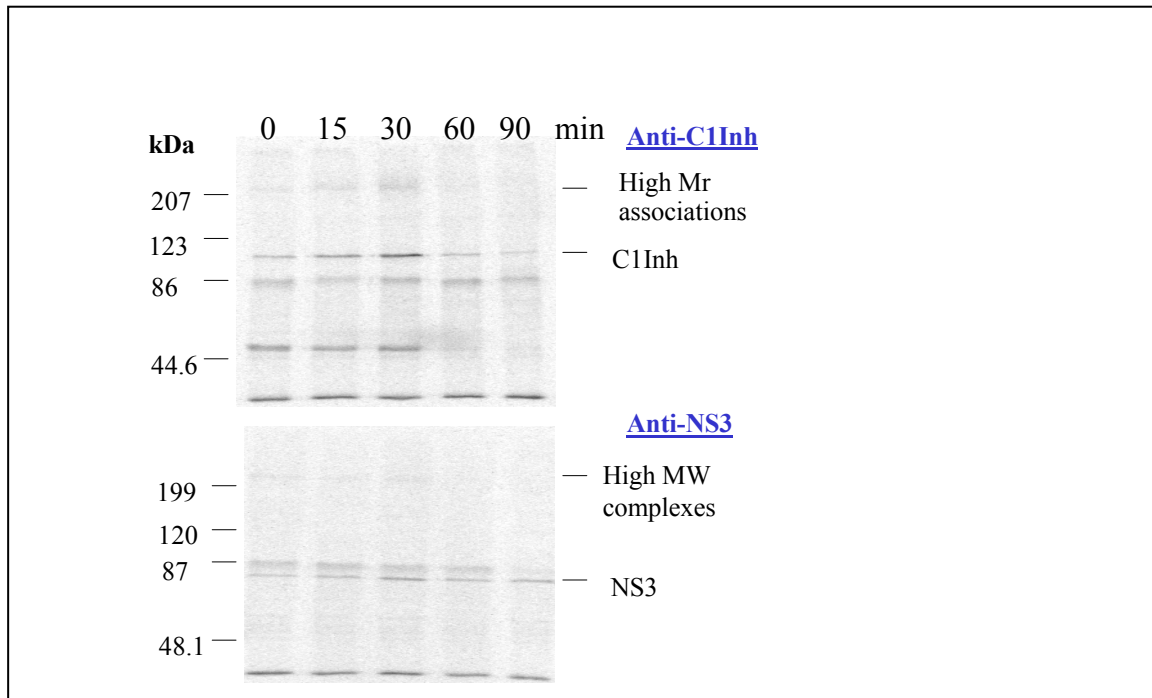


Fig 35: Biosynthèse de C1Inh par les cellules HepG2NT : expérience de pulse-chase. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-C1Inh et anti-NS3, réduits et dénaturés puis séparés sur gels d'électrophorèse en milieu réducteur. A la 30^e minute, on observe sur les deux gels des complexes de haut poids moléculaire.

3.1.3 C1Inh est capable d'inhiber l'activité protéase de NS3.

Nous avons montré que NS3 se comporte comme une sérine protéase cible de C1Inh : NS3 peut couper C1Inh et former des complexes de haut poids moléculaire, représentatifs de NS3-C1Inh. Nous avons donc examiné quel contrôle C1Inh pouvait exercer sur l'activité protéolytique de NS3 vis-à-vis d'un peptide cible (NS4B-5A). Nous avons comparé cet effet de C1Inh avec celui des anticorps 5C8B11, 9C1B7, 9A6C9.

L'activité de NS3 est partiellement inhibée par C1Inh (fig 36). C1Inh représente donc une SERPINE exerçant un contrôle partiel sur l'activité protéolytique portée par NS3.

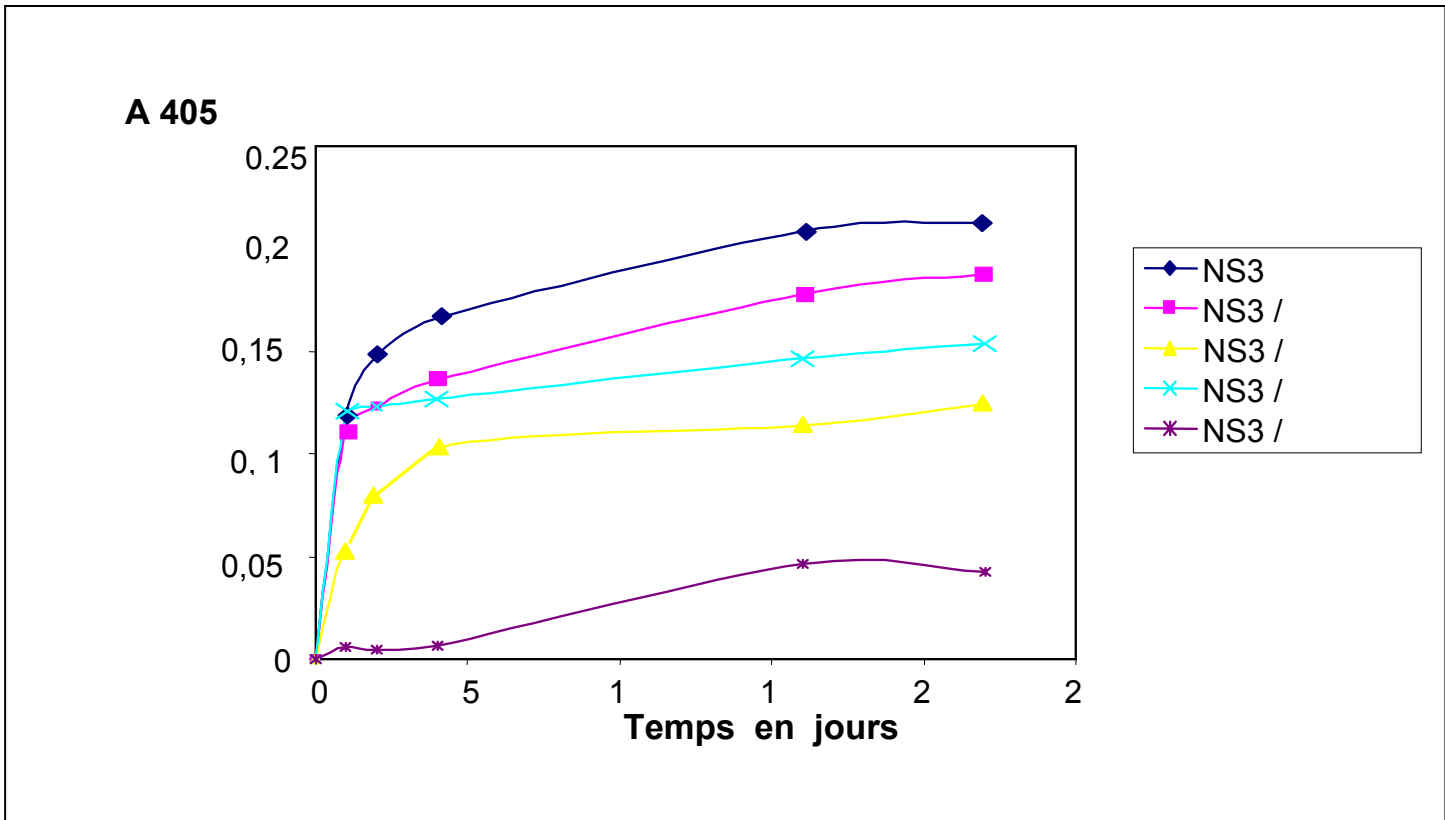
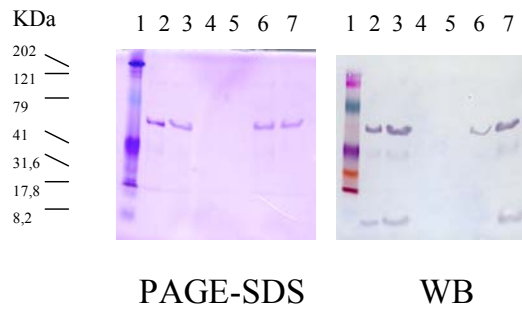


Fig 36: Activité protéolytique de NS3 vis-à-vis du peptide NS4B-5A. Cinétique enzymatique de NS3 en présence de C1Inh et des anticorps monoclonaux anti-NS3.

3.2 Interaction entre le CYP450 2D6 et NS3 RTS.

NS3 RTS et la sous unité 2D6 du cytochrome P450 sont incubés pendant 1 semaine à température ambiante. Le produit de digestion est analysé par un gel SDS-PAGE et immunoblot anti CYP450 2D6 (fig 37). On note une coupure de la protéine plus marquée en présence du peptide P148 (co-facteur de NS3 correspondant à NS4A) et sur l'immunoblot (piste 6). Le CYP450 2D6 est donc *in vitro* substrat de NS3.

L'adjonction de BILN 2061 (inhibiteur de la partie protéase de NS3) au mélange, fait disparaître la coupure du CYP 450 2D6 (fig 38). La coupure *in vitro* du CYP 450 2D6 est bien liée à l'activité protéase de NS3.



- 1 : témoin de poids moléculaire coloré
 - 2 : Cytochrome P450 2 D6 (0,5 µg non incubé)
 - 3 : Cytochrome P450 2 D6 (0,5 µg incubé 1 semaine)
 - 4 : NS3 RTS (10 µl, incubé 1 semaine)
 - 5 : NS3 RTS (10 µl), P148 80µM (incubés 1 semaine)
 - 6 : Cytochrome P450 2 D6 (0,5 µg), NS3 RTS (10 µl), P148 80µM (incubés 1 semaine)
 - 7 : Cytochrome P450 2 D6 (0,5 µg), NS3 RTS (10 µl) (incubés 1 semaine).
- WB : anti-Cyt P450 2 D6 (1/500 ; 1 nuit à +4°C + 2 h à t. amb)

24-02-04 & 31-03-04
LCB/BCH

Fig 37: Analyse par gel SDS-PAGE et immunoblot (WB) anti CYP450 2D6 de la digestion de CYP450 2D6 par NS3. Sur la piste 6 de l'immunoblot (NS3 incubée avec le CYP450 2D6), une diminution de l'intensité de la bande correspondant au CYP450 2D6 (Mr de 56 KDa) est mise en évidence.

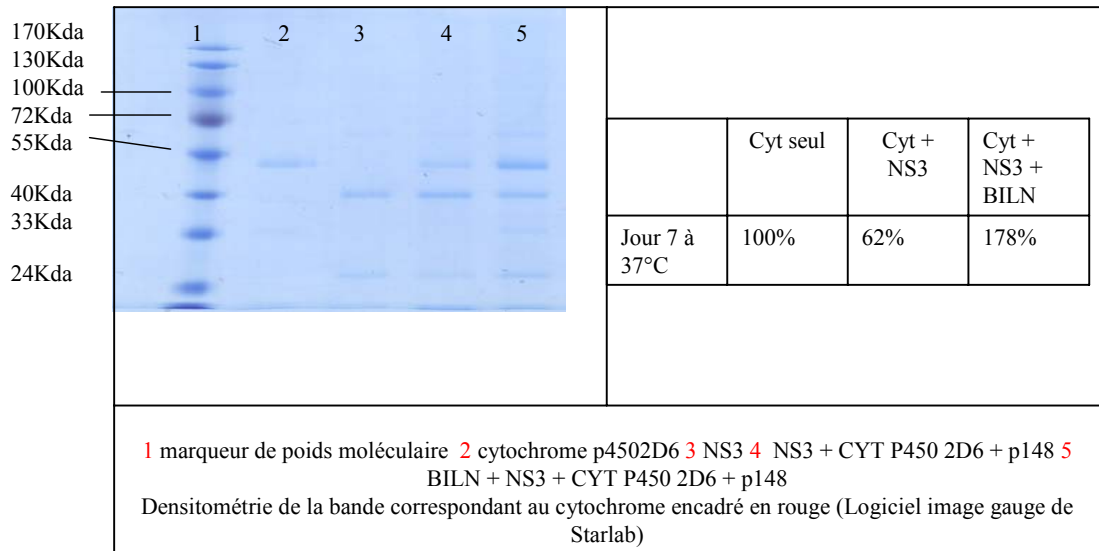


Fig 38 : Analyse par gel SDS-PAGE de la digestion de CYP450 2D6 par NS3 (coloration Coomassie). La coupure du CYP 450 2D6 en présence de NS3 est objectivée à la piste 4 et à l'absence de coupure en présence de BILN 2061 (piste 5).

4. Conséquences de l'inhibition de l'activité protéolytique de NS3 sur le stress cellulaire induit par la partie N-terminale de la polyprotéine du VHC

4.1 Diminution de la quantité d'HSP70 dans les lysats HepG2NT lorsque l'activité protéase de NS3 est bloquée par BILN 2061

Notre hypothèse principale était que NS3 était responsable par son activité protéolytique sur les protéines cellulaires, d'un stress cellulaire se traduisant par une augmentation de synthèse de l'HSP70. Nous avons donc dosé le taux d'HSP70 dans les lysats cellulaires HepG2NT en présence et en absence de BILN 2061. La quantité d'HSP70 est diminuée lorsque l'activité protéase de NS3 est bloquée (fig 39).

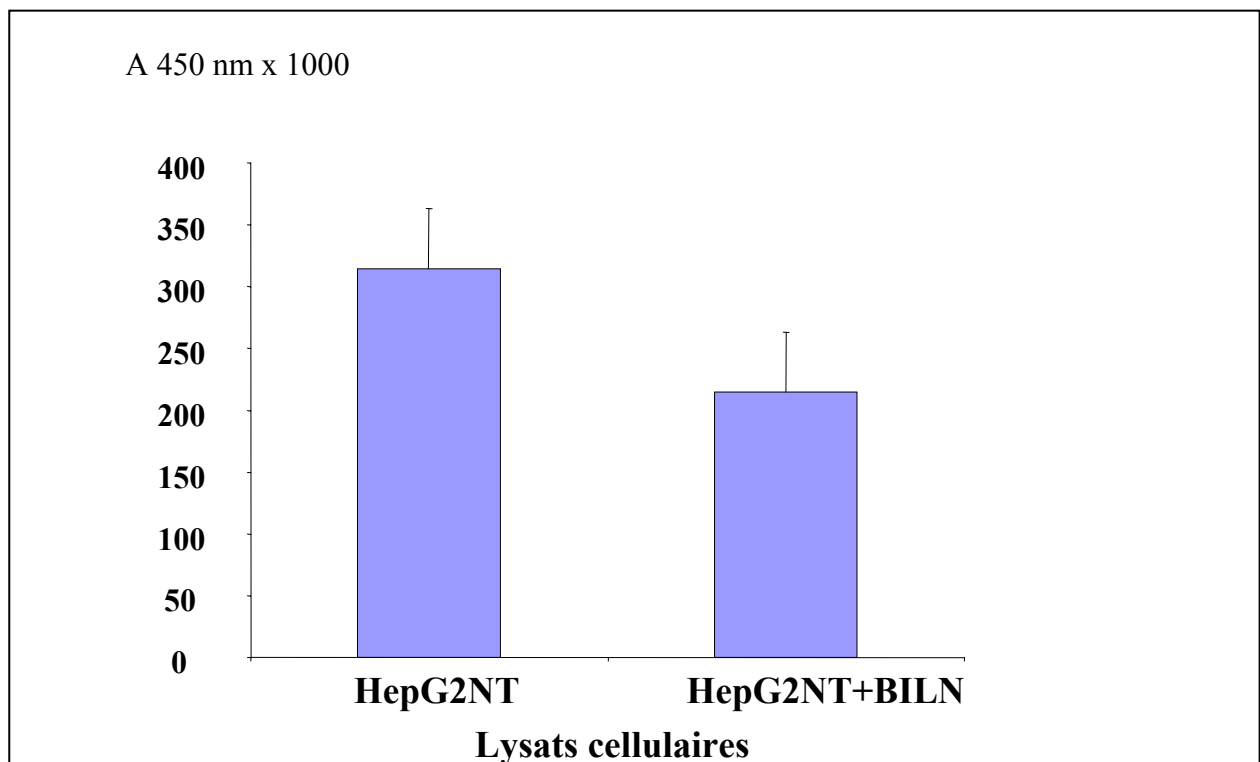


Fig 39 : Taux d'HSP70 dans les lysats cellulaires préparés à partir des cellules HepG2NT en présence ou en l'absence de l'inhibiteur de NS3. Le taux d'HSP est évalué à partir de tests ELISA, les valeurs d'absorbance ont été normalisées par rapport aux protéines totales pour rendre les mesures comparatives. Les barres d'histogramme représentent les moyennes, les barres verticales les valeurs de 1 écart-type.

La diminution de HSP70 en présence de l'inhibiteur est de 32,25%.

4.2 Influence de NS3 sur la quantité et la nature des peptides associés à HSP70

Nous avons purifié, comme précédemment, des complexes HSP70-peptides mais cette fois à partir de cellules HepG2 NT cultivées en présence de BILN 2061 afin de bloquer l'activité protéase de NS3 et ainsi de pointer son rôle dans l'émergence de peptides.

Après les mêmes étapes de purification que précédemment, des peptides ont été libérés des complexes HSP70-peptides et séparés par HPLC ; leur analyse est en cours par MALDI-TOF. Nous prévoyons de comparer ces peptides avec ceux issus d'HepG2 NT afin de savoir si l'adjonction de BILN 2061, et donc l'inhibition de l'activité protéase de NS3, est susceptible de les modifier.

Discussion :

1. Expression des HSP et des anticorps chez les patients souffrant d'hépatite C chronique

Afin de rechercher une implication des HSP dans l'infection chronique par le VHC et l'auto-immunité associée au virus, nous avons recherché chez les malades des marqueurs de stress cellulaire, comme la surexpression des HSP dans les tissus hépatiques et en périphérie (sang circulant).

1.1. Surexpression d'HSP70 dans les tissus hépatiques

L'analyse immunohistochimique anti-HSP70 des biopsies hépatiques des patients infectés et considérés comme répondeur au traitement par IFN, montre une surexpression d'HSP70 dans le noyau et dans le cytoplasme pour 10% des hépatocytes. Cet effectif faible de cellules marquées peut s'expliquer par le fait que le VHC infecte très peu d'hépatocytes (5-10%) et que seules les cellules infectées et donc stressées surexpriment l'HSP70. L'HSP70 est exprimée dans tous les compartiments cellulaires ; ainsi dans une culture de cellules HepG2, on note une immunofluorescence anti-HSP70 granuleuse, dans le cytoplasme, le noyau et les vacuoles de ces cellules. Si ces cellules sont stressées par la chaleur, l'immunofluorescence augmente dans le cytoplasme et le noyau [70]. Dans l'hépatite B, l'expression cellulaire de la chaperone gp96 a été étudiée de la même façon par immunohistochimie sur des biopsies d'hépatite B chronique, de cirrhose associée au VHB et de carcinome hépato cellulaire associé au VHB. La présence de gp96 est quasi absente sur les foies sains, mais on note une augmentation du marquage cytoplasmique (surtout dans les hépatocytes péri-portales) parallèlement à la gravité de la lésion hépatique : les biopsies de carcinome hépato-cellulaire sont celles qui marquent le plus [71]. Elles représentent notre témoin positif. La présence de différentes HSP a aussi été étudiée de la même façon (immunohistochimie et dot Blot) sur des biopsies de carcinome hépato-cellulaire associés au VHB. Les auteurs rapportent une corrélation forte entre le taux de grp78 et la progression de l'hépatocarcinome [72]. Ils notent aussi une corrélation entre les taux d'HSP 90, HSP 70, grp 78, grp 94 et les facteurs de mauvais pronostics du cancer (invasion vasculaire, métastases...). Nos résultats montreraient plutôt l'inverse : la présence d'HSP70 serait associée à une meilleure réponse thérapeutique et donc un meilleur pronostic. Cependant, au vue du faible effectif de patients, on ne peut conclure formellement quant à cette association. Une étude faite sur des cancers du sein montre elle aussi une association plutôt favorable entre la présence d'HSP70 et un pronostic favorable. Les auteurs ont montré une corrélation négative entre l'augmentation du taux d'HSP70 dans les cellules cancéreuses (déterminée par immunohistochimie et western Blot à partir de biopsies de tumeur du sein) et le risque de métastases [73]. On peut donc penser que lorsque des cellules stressées par des conditions pathologiques (cancers, infections, inflammation) surexpriment l'HSP70, ce phénomène serait plutôt protecteur pour l'organisme. Il a été montré la présence d'HSP70 sur la membrane de cellules tumorales [56], et l'absence à la surface de cellules saines. Il est probable que la présence d'HSP70 à la surface cellulaire favorise la reconnaissance spécifique de la tumeur par les cellules NK et les LT8 [74]. Takashima et al [75] retiennent les HSP70 comme biomarqueur des hépatocarcinomes associés au VHC : à partir de biopsies hépatiques, ils ont montré par électrophorèse en 2D et analyse des espèces moléculaires par MALDI, l'augmentation de l'expression de 9 protéines dont 4 sont les HSc70, HS70, grp78, et grp75. L'élévation concomitante des 4 protéines n'est pas retrouvée dans les carcinomes hépatocellulaire associé au VHB (surexpression uniquement de HSc70 et de

grp78), ni dans les carcinomes hépatocellulaires non d'origine virale. Dans d'autres cancers (sein, gastro-intestinaux), on note aussi une surexpression des HSP mais jamais l'expression de toutes les 4 en même temps.

1.2 Elévation de l'antigénémie HSP70

Nous avons aussi observé une augmentation du taux d'HSP70 dans le sérum des patients. L'antigénémie HSP70 est statistiquement plus élevée chez les patients infectés par le VHC par rapport aux patients non infectés. Cette élévation serait plus marquée chez les patients ayant une dysimmunité associée au VHC. Par contre l'antigénémie ne semble pas être influencée par la réponse thérapeutique à l'IFN. Chez le sujet sain, il a été montré la présence d'HSP70 dans le sang [76], taux plus élevé chez la femme et augmentant avec l'âge [77]. Le taux d'HSP augmente dans le contexte inflammatoire et infectieux. Une corrélation positive avec le taux de CRP et la concentration de cytokines inflammatoires (TNF α , IL10, et IL6) est rapportée [77, 78]. L'antigénémie d'HSP70 augmente aussi dans les pathologies vasculaires (athérosclérose, HTA) et les infarctus du myocarde (IDM): il y a une augmentation rapide de l'antigénémie HSP70 après un IDM, et cette augmentation est corrélée avec l'élévation des enzymes cardiaques (CPK MB, troponine) et l'IL6 et IL8 [79]. Chez les patients lupiques, on retrouve la même corrélation positive entre le taux d'HSP90 et le taux d'IL6 [80]. Les HSP sont relarguées par les cellules nécrosées (et non apoptotiques) mais elles sont aussi secrétées par les cellules gliales, les LB, les cellules mononuclées, les cellules cancéreuses après stimulation par l'IFN, et l'IL10 [46]. L'antigénémie HSP sanguine jouerait alors un rôle d'alerte du stress intra-cellulaire et déclencherait une réaction immune non spécifique avec libération de cytokines inflammatoires (tableau 18).

HSP	Cellules cibles	Libération de cytokines et autres actions
HSP60	Macrophages Cellules endothéliales, Musculaire lisse vasculaire	IL1, IL6, IL12, IL15, TNF α , NO Augmentation CD54, CD62 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1
HSP70	Monocytes, macrophages Cellules dendritiques	IL6, IL12, IL1, TNF α , Activation NFkB, maturation des CD
HSP90	Cellules dendritiques	IL12, TNF α , GM-CSF

Tableau 18: cellules cibles des HSP et effets [44,81].

Dans la plupart des études, le taux d'antigène est corrélé au taux d'anticorps anti-HSP : chez les sujet sain [76], comme dans le contexte infectieux [78]. L'apparition des anticorps permet sans doute de contrôler l'effet inflammatoire des HSP et donc de jouer un rôle immunomodulateur. Nous ne retrouvons pas cette corrélation entre le taux d'anticorps anti-HSP70 et l'antigénémie; il pourrait s'agir d'un problème de sensibilité de la mesure de l'antigénémie; nous avons rencontré en effet, des problèmes d'étalonnage du taux d'HSP70 (résultats aberrants suivant les concentrations d'HSP recombinante). Les dernières études publiées rapportent les bonnes performances d'un kit de dosage, commercialisé par Stressgen (EKS-700) ; il pourrait être opportun de confirmer nos dosages avec ce type de test.

1.3 Présence et intérêt des anticorps anti-HSP

La présence d'anticorps anti-HSP est largement rapportée dans les maladies auto-immunes [52], plus rarement dans les infections virales. Des anticorps anti-HSP70 ont été rapportés

dans le contexte de l'infection par le VIH [82]. Fukuda et al [83] ont rapporté la présence de réactivité de sérum de patients ayant une hépatite B ou C chronique vis-à-vis de lysats cellulaires (HepG2) : 20 spots protéiques ont été détectés ; 2 d'entre eux ont été identifiés comme correspondant aux HSP70 et HSP60. Shingai et al [84] n'ont pas retrouvé eux, d'anticorps anti-HSP70 chez des patients ayant une hépatite B ou C chronique. Ils ont par contre rapporté la présence d'anticorps anti-HSP70 chez 52,9% de patients ayant une hépatite auto-immune. Ces éléments sont en accord avec nos résultats, n'ayant pas trouvé d'anticorps anti-HSP70 et 90 chez les patients VHC positifs, sauf lorsque était présente une manifestation extra hépatique dysimmunitaire. La présence d'anticorps anti-HSP n'est pas associée à celle d'autres auto-anticorps, mais ils sont nettement présents lorsque surviennent des manifestations cliniques dysimmunitaires. La présence d'anticorps anti-HSP est largement rapportée dans le cadre de maladies auto-immunes : maladie de Behçet [85], PR [86], surdité auto-immune [87], artérite de Takayashu [88], uvéite [89], diabète auto-immun [90], sclérose en plaques [52].... Dans le lupus, cette réactivité anti-HSP est largement documentée et nous a incité à choisir ce groupe de malades comme témoin positif. Conroy et al [91] ont rapporté la présence d'anticorps HSP90 chez 35% des patients lupiques et l'association de ces anticorps avec la présence d'une atteinte rénale. L'analyse des biopsies rénales des patients lupiques retrouve la présence d'HSP90 (immunohistochimie) dans les glomérules (fluorescence granuleuse) et son absence dans les reins sains [92]. Des anticorps anti-HSP60 sont aussi rapportés chez les patients lupiques [93]; ils sont associés à la présence de thrombose et d'anticoagulant lupique. Enfin, on note la présence d'HSP70 à la jonction dermo-hypodermique sur 60% de biopsies de peau de patients lupiques (IF) [94]. Chez nos patients VHC AI, la présence d'anticorps anti-HSP est indépendante de la présence des autres anticorps, mais notre effectif de patients est faible. Chez les patients VHC, la présence d'auto-anticorps est fréquente (tableau 19) mais leur signification clinique est inconnue [95]. Dans la population VHC AI rapportée par Ramos-Casals et al [96], on note une prévalence plus élevée des ACAN, ce que nous retrouvons aussi dans notre population VHC AI lyonnaise.

Type d'anticorps	% VHC [95]	% VCH 1 (notre étude)	% VCH AI du registre HISPAMEC [96]	% VCH AI (notre étude)
FR	45-70%	36,6%	56%	35%
Cryoglobuline	40-55%	13,3%	62%	20%
ACAN	10-20%	10%	69%	35%
Ac anti-HSP		0%		25-50%

Tableau 19: Comparaison des prévalences des auto-anticorps chez les patients VHC dans la littérature et dans notre étude.

Dans la plupart des cas, la présence de cryoglobuline et des autres auto-anticorps est asymptomatique. Ainsi, dans l'étude du Pr Cacoub [26], on note que 70% des patients VHC ont au moins un autoanticorps, mais seulement 39% ont au moins une manifestation extra-hépatique. 56% des patients ont un dosage de cryoglobuline positif, mais seulement 4,8% ont une cryoglobuline mixte ; la présence de cryoglobuline est toutefois associée avec la présence de vascularite systémique, de lésions cutanées, et de glomérulonéphrite. Par contre, on note chez ces patients moins de syndrome sec.

Bien que nous n'ayons pu comparer toutes les données chez les patients VHC AI (ils nous manquaient leur données histologiques et virémiques), les profils clinique, biologique et histologique de l'hépatite C chronique (complets chez les patients VHC 1) ne semblent pas montrer de corrélations avec la présence d'anticorps anti-HSP. Les autres auto-anticorps [97, 98] ne présentent pas non plus d'association particulière avec l'âge, le sexe, le génotype, le

taux de transaminases, ou le grade histologique. Wasmuth et al [99] montrerait seulement une association entre les autoanticorps et une élévation de la charge virale et des TGO. La présence de cryoglobuline est associée avec un âge avancé, le sexe féminin, une durée longue de l'infection et la présence de cirrhose [100].

Nous avons montré clairement que l'immunité anti-HSP70 et 90 était associée aux manifestations auto-immunes liées au VHC, de manière indépendante des autres auto-anticorps. Ce potentiel prédictif d'une pathologie auto-immune, par le titre des anticorps anti-HSP, est retrouvé dans la transplantation de moelle : lorsque des patients développent des anticorps anti-HSP70 et 90 dans les 30 à 90 jours qui suivent leur transplantation de moelle, ils risquent de présenter une réaction du greffon contre l'hôte [101].

L'analyse des sous groupes de patients répondeurs ou non au traitement est un peu décevante. Il n'y a pas de relation particulière entre le taux d'anticorps anti-HSP70 et 90 et la réponse thérapeutique. Cette absence de liaison est aussi retrouvée avec les autres auto-anticorps présents dans l'infection chronique par le VHC. Trois études montrent une prévalence équivalente de la réponse thérapeutique chez les patients avec ou sans auto-anticorps [97, 102, 103]. Un seul travail [99] a montré le contraire mais sur un effectif plus petit (78 patients VHC contre plus de 1100 patients pour les 3 autres études): les patients sans auto-anticorps auraient une meilleure réponse thérapeutique à l'association IFN et ribavirine.

Cependant, dans notre étude, l'analyse des résultats des anticorps anti-grp78 met en évidence une différence à la limite de la significativité entre les patients répondeurs et non répondeurs. La présence d'anticorps anti-grp78 (qui est une chaperonne du RE) serait associée à un meilleur pronostic thérapeutique. Il serait intéressant de faire les dosages d'anticorps anti-grp78 sous traitement pour voir si le traitement par IFN modifie l'expression de ces anticorps. Dans le cadre de l'infection par le VIH, il a été montré que le taux d'anticorps anti-HSP70 diminuait sous traitement, parallèlement à la baisse de la charge virale et à l'augmentation du taux de lymphocytes CD4 [82]. Nous n'avons pas retrouvé de modification des antigénémies d'HSP70 et 90 sous traitement en sachant que les taux d'anticorps étaient très faibles chez les patients VHC sans manifestation AI associée. Ceci peut expliquer l'absence d'évolutivité retrouvée par manque de sensibilité des tests utilisés. Une étude a montré aussi l'absence de modification du profil de l'auto-immunité biologique (anticorps anti-nucléaires solubles) sous traitement par IFN [104]. Par contre, il est souvent rapporté une amélioration des signes cliniques sous traitement.

2. Les sérums des patients infectés par le VHC développent une réactivité vis-à-vis du contenu protéique des cellules HepG2 NT

2.1 A la recherche de nouveaux antigènes cibles présents dans les hépatocytes infectés par le VHC et qui seraient reconnus par les patients ayant des manifestations auto-immunes associées au VHC, nous avons tout d'abord testé, comme Fukuda et al [83], la réactivité des sérums des patients vis-à-vis de lysats de cellules HepG2. Les patients infectés par le VHC ont une réactivité supérieure à celles des patients contrôles négatifs ; cette réactivité est par contre plus faible que celle des patients lupiques (contrôles positifs). Les patients VHC reconnaissent donc spécifiquement certains antigènes cellulaires; Fukuda et al [83] en proposent quatre: les HSP 70 et 60, l'actine et un nouvel antigène l'hépalamine. La réactivité vis-à-vis des lysats n'est pas influencée par l'existence ou non de maladies auto-immune associées ni avec la présence d'autres auto-anticorps.

En utilisant un modèle cellulaire de cellules HepG2 exprimant de manière stable les protéines de la partie N-terminale de la polyprotéine virale (C, E1, E2, NS2, NS3), nous avons voulu déterminer s'il existait une réactivité similaire des sérums de nos patients. Les patients VHC ont une réactivité similaire vis-à-vis des lysats HepG2 NT voir un peu plus élevée mais la

différence n'est pas significative. Les patients contrôles négatifs présentent plutôt une baisse de leur réactivité alors que les patients lupiques (contrôles positifs) ont une augmentation du taux d'anticorps statistiquement significative.

2.2 Contrairement aux anticorps anti-HSP, les anticorps anti-lysats HepG2NT sont corrélés au degré de souffrance cellulaire (taux de TGO) et tissulaire (score METAVIR inflammatoire). Ils sont donc associés à la sévérité de la maladie. Il a été montré aussi cette association avec d'autres anticorps : la présence de cryoglobuline type II et d'Ac anti-GOR (peptide dérivé d'une exonucléase) seraient corrélées avec le taux de TGO [105]; la présence d'anticorps anti-hépalamine serait associée à une inflammation hépatique plus sévère [83]. Les anticorps anti-GOR seraient aussi liés à une virémie élevée [106]. Nous n'avons pas retrouvé cette corrélation avec les anticorps anti-lysats HepG2NT.

La deuxième corrélation importante retrouvée est celle qui existe entre le taux d'anticorps anti-lysats et la réponse thérapeutique. La présence de ces anticorps serait elle un facteur prédictif de réponse favorable à l'IFN, comme il l'a été rapporté avec l'anticorps anti-CD69 (antigène marqueur d'activation des LT) [107] ou avec les anticorps anti-E2et anti-NS5 (antigènes viraux) [2,108]. Cependant, n'oublions pas que le meilleur indice prédictif à la réponse thérapeutique reste le génotype viral [4].

On peut donc émettre l'argument que plus l'hépatite chronique C est active, plus il y a une nécrose cellulaire qui libère des antigènes cryptiques reconnus par certains patients et qui auraient un rôle dans la clearance virale peut-être en favorisant une réaction immunitaire dirigée spécifiquement vers les cellules infectées. Cependant, jusque là, il n'a pas été rapporté dans la littérature, que les patients ayant une maladie auto-immune associée au VHC aient une meilleure clearance virale ou une meilleure réponse thérapeutique.

Les patients VHC reconnaissent donc dans ces lysats HepG2 NT des antigènes qui ne sont pas que d'origine virale : tout d'abord parce que leur sérum réagit vis-à-vis de lysats non transfectés et aussi par le fait que les patients lupiques non VHC positifs reconnaissent aussi ces antigènes.

2.3 Quels sont ces antigènes ?

Fukuda et al [83] a mis en évidence par MALDI (après séparation par une électrophorèse en 2 dimensions) quatre antigènes cibles, dont l'HSP70. Les cellules HepG2 NT surexpriment-elles (comme les hépatocytes des patients) des protéines chaperonnes ?

Effectivement dans notre étude, le taux d'HSP70 et d'HSP90 est plus élevé dans les lysats transfectés que dans les lysats témoins. La méthode de dosage par ELISA que nous avons utilisé, a été validée par une étude récente de 2003 [66], qui a montré ses performances face à la cytométrie en flux (méthode chère) et au Western Blot (méthode qualitative plus subjective pour la quantification).

Cette augmentation des HSP et aussi retrouvé chez les fibroblastes infectés par le CMV [109]: on note une augmentation de l'ARN de l'HSP70 dans les 8h qui suivent l'infection et du taux de protéines dans les 16h. Le même événement est rapporté avec l'adénovirus infectant des cellules HeLa et avec le VIH infectant les LT4. L'HSP70 serait même secrété à la surface des lymphocytes infectés par le VIH et contribueraient ainsi à la défense anti-virale [110]. Les lymphocytes B immortalisés par l'EBV expriment l'HSP90; cette chaperonne favorise la prolifération des LT [111], prolifération inhibée par l'anticorps anti-HSP90. Il a été montré que la protéine E2 du VHC active les promoteurs de grp78 et grp94 comme certaines protéines de surface du VHB [37]. Il existe aussi des interactions entre certaines protéines virales et des HSP : l'HSP90 serait un cofacteur du clivage de NS2-NS3 [112]; l'HSP27 interagit avec NS5A [113]. Federico et al ont dosé le taux d'HSP27 dans les monocytes de patients ayant une hépatite chronique C [114]. Le taux d'HSP27 est plus élevé que celui

retrouvé dans les monocytes contrôles; ce taux élevé d'HSP27 dans les monocytes est associé à un taux élevé de TGO et TGP, et de cytokines pro-inflammatoires (IL6, TNF α).

L'augmentation des HSP dans les lysats transfectés peut expliquer en partie la présence d'anticorps anti-HSP dans les sérums des patients VHC positifs. L'infection virale induirait un stress des hépatocytes (voir les lymphocytes) qui produiraient alors des HSP. Elles seraient libérées dans le secteur extracellulaire lors de la nécrose des hépatocytes, voir par sécrétion. La présence d'HSP favoriserait l'émergence d'anticorps anti-HSP et d'auto-immunité. Il est probable que les HSP70 et 90 ne sont pas secrétées seules; vu leur haute capacité à s'associer à des peptides antigéniques (ce sont de véritable éponges à peptides), elles sont sans doute libérées sous forme de complexes HSP-peptides. Elles favoriseraient alors la présentation d'antigène cryptique cellulaire (ou virale) au système immunitaire cellulaire (aux LT8, plus faiblement aux LT4) et donc l'apparition d'une auto-immunité. Eggleton [115] explique ainsi bien ce phénomène dans le modèle lupique : lorsque les protéines nucléaires Ro52 et Ro60 sont associées avec les protéines de stress grp 78 [116] ou calréticuline [117], elles déclencheraient une réponse immunitaire 400 fois plus importante que seule (fig 40).

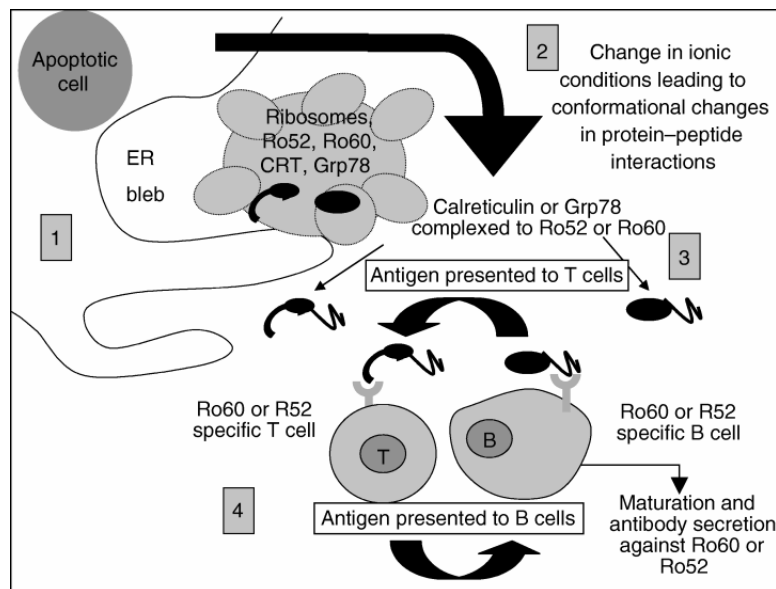


Fig 40: rôle des protéines de stress dans la présentation des Ag Ro60 et Ro52 [115]

Dans un modèle de diabète auto-immun chez la souris, la co-administration de l'HSP70 et d'un épitope immunodominant déclenche le diabète alors que l'administration seule de chacune des 2 protéines ne provoque rien. L'HSP70 joue le même rôle d'adjuvant que le LPS [118]. Dans la polyarthrite rhumatoïde, il existe une interaction étroite entre l'HSP73 et l'HLA DRB1*0401 dans les lysosomes. L'HSP70 pourrait jouer le rôle d'un auto-antigène (il présente des homologies avec le collagène de type II) mais présenté seul, il ne déclenche pas de réponse cellulaire. Il doit donc jouer un rôle d'adjuvant d'un antigène et faciliter sa présentation et captation par le système HLA (fig 41) [119].

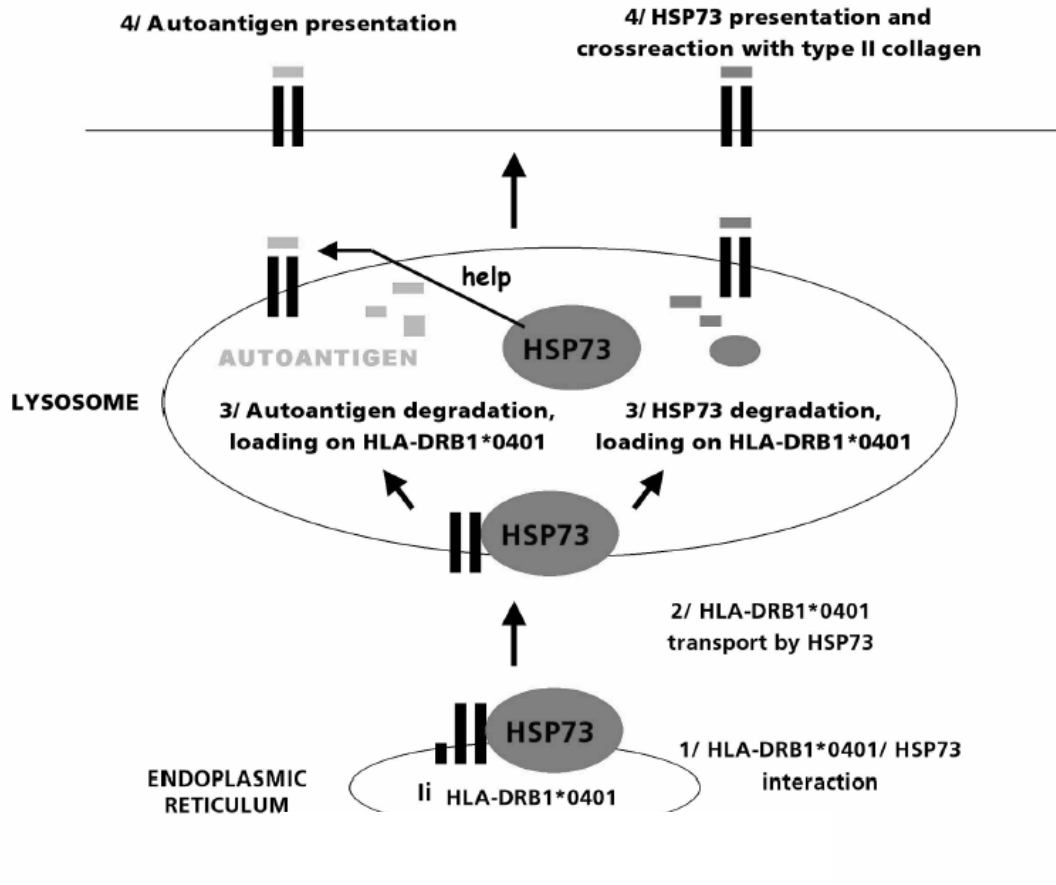


Fig 41: rôle de l'HSP73 dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde [119]

3. Caractérisation des associations HSP70-peptides

Nous avons décidé de purifier des complexes HSP70-peptides à partir de cellules HepG2NT afin de mettre en évidence l'existence d'un ou plusieurs peptides associés à cette HSP et potentiellement antigénique. Afin de bien associer la présence de ce ou ces peptides avec la présence des protéines virales, nous avons réalisé les mêmes manipulations à partir de cellules transfectées avec le vecteur vide qui servent alors de témoin négatif. Ces techniques de purification de complexes sont bien validées par Srivastava et al. Le premier en 1997, il a développé des méthodes de purification des complexes à partir de tissus tumoraux, et a montré l'intérêt immunologique de ceux-ci [68, 69]. Il a purifié des complexes gp96, HSP70, HSP90, calréticuline-peptides à partir de tumeurs animales et humaines par des techniques de chromatographie d'affinité. Il a montré que ces complexes pouvaient déclencher une forte réaction LT8 spécifique (potentiel vaccinal) chez l'animal et l'homme.

Par la suite, les méthodes ont été adaptées [69, 120] et ont permis d'obtenir une préparation pure à 70-90% (sur gel de Coomassie) et un rendement de 40-200 µg de complexes par gramme ou ml de préparations tissulaires ou cellulaires. Michils et al [54] ont purifié des complexes HSP70-peptides à partir de tumeur pulmonaires (obtenues chirurgicalement) ; ils ont noté une prolifération des cellules mononuclées périphériques des patients cancéreux en présence des complexes (issus de leur tumeur) alors qu'il n'y en avait aucune chez les sujets contrôles en présence de complexes issus de leur tissu pulmonaire sain. Il est certain que les complexes HSP-peptides issus de tissus sains ne déclenchent pas d'immunité contrairement à ceux issus de tissus pathologiques [121]. Les complexes HSP70-peptides auraient un potentiel

immunogène plus important que les complexes HSP90-peptides; de plus l'HSP70 se complexerait à des peptides plus longs.

Ces techniques ont aussi été utilisées dans des contextes infectieux. Des complexes gp96-peptides ont été purifiés à partir de cellules transfectées avec une protéine du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). Ces complexes étaient capables de sensibiliser des LT8 [122]. De même, des complexes gp96-peptides ont été purifiés à partir d'hépatocarcinome induit par le VHB [123] avec pour contrôle négatif un foie normal (donneur sain).

Nous avons réalisé les mêmes étapes décrites par Srivastava [68]. Nous avons donc purifié les complexes à partir de lysat cellulaire par des techniques de chromatographie d'affinité et d'échanges d'ions. A cette étape, nous pouvons noter un taux plus faible de complexes obtenus à partir des cellules HepG2SW comparativement à HepG2NT (113 µg contre 143 µg), bien que l'on ne puisse formellement assurer que les conditions de manipulations aient été strictement les mêmes pour les 2 cellules. Nous notons aussi une différence de migration électrophorétique entre les complexes issus des cellules HepG2NT et ceux issus des cellules témoins HepG2 SW. Ces derniers semblent en quantité plus faible et semblent moins polymorphes (la bande électrophorétique est plus fine).

L'analyse par MALDI-TOF et LC/MS/MS des bandes électrophorétiques de Mr 70 kDa issues des cellules HepG2NT, confirme la présence d'HSP70 ainsi que celle de grp78. Ces HSP sont probablement en grande partie sous formes de complexes HSP-peptides comme l'a montré Srivastava [124] lorsqu'on utilise une colonne ADP d'affinité. Après libération des peptides des complexes grâce l'ATP, ils sont séparés sur une colonne C18 par HPLC. Cette première analyse n'est pas informative; ce phénomène est retrouvé de la même façon dans l'étude sur le VSV [122]. Il est probable que les quantités protéiques sont très faibles et que nous manquions de sensibilité. Il aurait été possible de stimuler (chaleur, prostaglandine [125] la production d'HSP70 par les cellules, afin d'obtenir de plus grande quantité de complexes mais cela aurait créé un stress qui aurait pu interférer avec celui induit par les protéines virales et fausser nos résultats. L'utilisation du système MALDI est indispensable pour analyser finement les peptides. On met alors en évidence dans un pool (issu de la chromatographie sur matrice C18) 8 pics protéiques présents dans les cellules HepG2NT et absents des cellules HepG2 SW. L'étude avec le VSV montre aussi après analyse par MALDI, d'une fraction issue de l'HPLC, la présence d'un pic absent des cellules témoins (fig 42). Dans cette étude, la fraction a été sélectionnée par sa faculté à sensibiliser des LT8 reconnaissant le VSV et à lyser des cellules cibles [122].

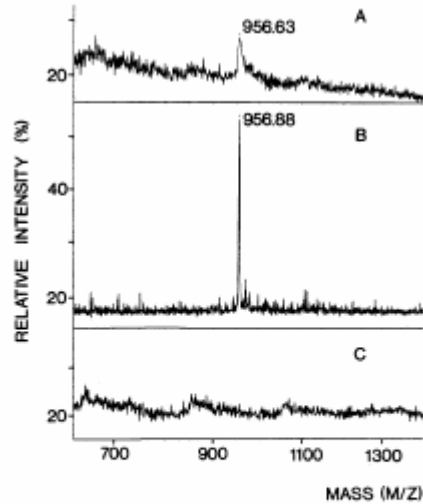


Fig. 3. VSV8 is identified as the antigenic peptide endogenously bound to gp96 in VSV-infected EL4 cells. Using Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (Lasermat, Finnigan, U.K.), a single peptide of 956-Da was identified in HPLC fraction 19 of gp96 (Fig. 2A) eluted material (A). This equals the mass of synthetic VSV8 (B). In the corresponding HPLC fraction of uninfected EL4 cells, this mass was not detected (C).

Fig 42: profil MALDI des peptides issus de cellules transfectés (A) et non transfectées (C) [122].

Dans l'étude faite avec le VHB [123,126], les auteurs ont pu montré cette différence dès le stade de la séparation HPLC : il existe un pic présent chez les 3 patients porteurs d'une CHC associé au VHB et absent du témoin (fig 43). On peut penser que les auteurs purifiant les peptides à partir de tumeurs, ils ont disposé de plus de matériel.

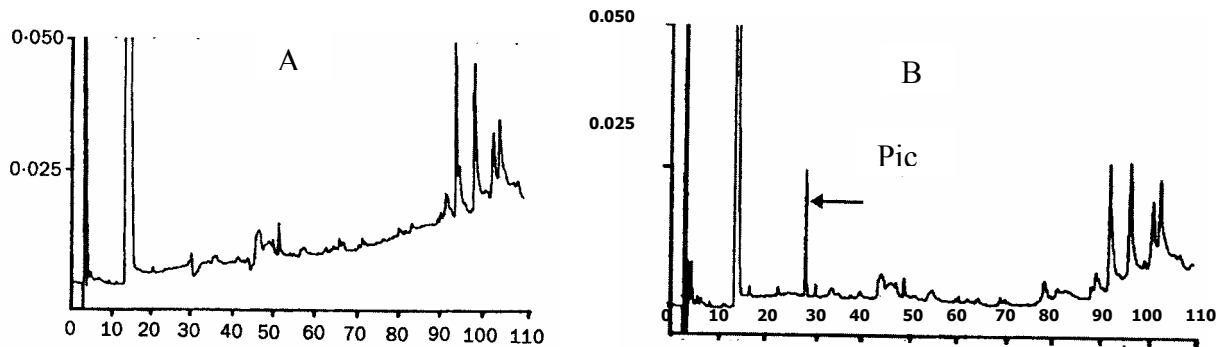


Fig 43: Profil HPLC (colonne C18) après analyse par MALDI des peptides isolés à partir de CHC associé au VHB (B) et de tissu hépatique sain (A). Un pic est présent dans B et absent du A [126].

Afin de préciser les peptides d'intérêt parmi les 8 précédents et de déterminer leur séquence, une nouvelle séparation par chromatographie phase reverse a été engagée et a permis de retenir l'identification de 2 peptides (MALDI-TOF, LC-MS/MS). L'une d'entre elle correspondrait à une protéine inconnue (« protéine hypothétique humaine »). L'autre séquence ne correspond en aucun cas à des protéines virales ou à des protéines cellulaires identifiées (cytochrome, C1Inh, hépalamine, et autres antigènes connus liés au contexte dysimmunitaire). Dans les 2 autres études précédentes, le peptide isolé correspondait à des séquences de certaines protéines virales : le core pour le VHB (après séquençage), un peptide

immunodominant issu du core du VSV (par comparaison du profil m/z). Les protéines de stress sont connues en effet pour s'associer à des glycoprotéines virales : oreillons [127], VHB [128], HSV [129], rotavirus [130, 131], virus syncytial respiratoire [112], VSV [122]. Grossmann et al [132] ont analysé en 2004 les profils des peptides potentiellement associés à l'HSP70. A partir de cultures de cellules cancéreuses prostatiques (stimulées avec de la prostaglandine), ils ont purifié les complexes selon le même protocole. Par MALDI, les pics les plus importants ont été identifiés (plus de 100 peptides ont été identifiés). Les séquences de ces peptides correspondaient à plusieurs protéines dont l'actine, la protéine kinase 1, la sous unité I de l'oxydase du cytochrome C, le GAPDH....(tableau 20)

Table 1

(A) General peptides eluted from Hsp70

Gene	Accession number	Peptide sequence	Highest 9-AA matrix score
Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 4	gi: 400625	AKVKGDGTSATTE	1564.45
Potassium voltage-gated channel, shaker-related 1	gi: 6754412	FRSEEDPFLPKKEYDQV	735.03
Coagulation factor V	gi: 6679731	TMVVLPLGPKGSGNREQQK	691.24
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 beta	gi: 6679331	PSASVMPVKKIGHR	638.35
Actin	gi: 38079974	EKSVLEFDQQVITDNE	604.13
Protein kinase 1 (EC: 2.7.1), testis-specific—mouse (TESK 1)	gi: 7428033	PATPPLVPPRHLSTQLPLVT	494.52
Putative T1-812 receptor-binding protein	gi: 1225892	STSEKLVFFLEFDSPQ	234.12
Hypothetical N5-I ORF5' E129 protein—mouse	gi: 2143484	SVPFAGHVPFLWHTTEAHH	208.14
Heat shock protein 60	gi: 284763	EDQKQGEHKKR	145.51
Keratin 813	gi: 288246	LLQLAVCENNRIGHYMMV	120.27
Eye absent homolog 2	gi: 3183000	GRDITTSVRRGLM	93.97
Intein-like growth factor 2, binding protein 1 (IMP1)	gi: 6753518	KISVSGQLVKSGYAFVDCPD	92.57
Zinc finger protein 161	gi: 6678637	VDSSEVEEFLRSIK	73.58
Cytosine nucleotide-binding protein G(O), alpha subunit 2	gi: 120979	VRAMDVLGVVEYGDSEK	42.29
Similar to TAR (HIV) RNA binding protein 2 (yrbp)	gi: 12805141	KGGSMLEPELEDSIS	36.32
Calpain, small subunit 1	gi: 6753256	VLLGQLSGAAGGGGGGGGMGLGG	21.59
Tyrosine protein kinase SYK	gi: 1711636	GMRGSEVTDMLEKGRMGIC	19.94
Procollagen, type V, alpha 1	gi: 7656987	QQNPGAQQLGPPQAKPPG	18.81
Arlavin 1	gi: 13624297	MIRSRHNGLRVVP	17.84
Zinc finger protein 95	gi: 11136156	RQKRLRSGDQVNRKQSSNGERGH	15.42
Putקיני cell protein 1	gi: 120687	TEQRKQKQKILLGHP	12.82
Elongation factor 2	gi: 3642667	RVAVEAKNPAELPRLVE	12.47
Mitogen activated protein kinase kinase kinase 4	gi: 6754630	FMLQEVLGGLEKTDENM	11.34
Bcl2-like 3B	gi: 16945062	RRANSVQAARPAAPVPSPA	8.75
Cytochrome c oxidase subunit I	gi: 5835487	FTVGLDVIDRAVETS	8.37
Actin	gi: 38079974	ELRVAPEEHPVLL	7.66
Aldolase oxidase	gi: 4884674	CEVEQQAATRFCHSYIP	6.91
Thyroglobulin precursor	gi: 12644045	CEVEQQAATRFCHSYIP	6.91
Hypoxanthine-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 3	gi: 6680191	RTGRSQVSLGPP	6.86
Arginine-tRNA-protein transferase 1	gi: 7304905	EPMDSTVEDAVDGDFAINKLEH	5.95
L-phenoxin	gi: 2959886	EVKLPKMPHMAVDVHLPELQLP	5.18
L-phenoxin	gi: 2959886	MAVVDVHLPELQV	4.72
Profile rich protein expressed in brain (prfb)	gi: 6755182	QTHLPQAPPYTDAPPAYSE	3.65
Alpha-methylacyl-Co A racemase	gi: 12832357	VLALFERFRSGRQK	2.32
Angiopoietin 4	gi: 6753006	WLLKLEQSKVNLRSHEVQA	2.32
Olfactory receptor MOR103-6	gi: 18479642	VSPLLNSCTHVA	1.93
Bone morphogenetic protein 3b precursor	gi: 2501174	RGAGCGRGPPSWSL	1.2
Protein tyrosine phosphatase receptor type N	gi: 14193733	TFSPFLGSSVLL	1.18
Protein inhibitor of activated STAT 1	gi: 9790155	HGHGVAISRSADH	.95
Timelase homolog	gi: 6755789	NVRLLEEDP	.27
IA beta 2	gi: 2555191	TGLVRSGLDWTQTTVMLE	-.19
5S-guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 37	gi: 12835823	RMHESMKLFDS	0

(B) Peptide sequences from GAPDH and EF-1 alpha that were eluted from Hsp70

GAPDH sequences	EF-1 alpha sequences
EVVAINDPFDLN	LIVAAGVGEFE
EVVAINDPFDL	EVSTYIKRQGYNPDIVA
ENGLKLVINGKPTTFQE	KIGGIGTVPVGRVE
ENGLKLVINGKPTI	YKKGIGTVPVGRVE
INGKPTTFQE	DVYKIGGTVPVGRVE
NGKPTTFQE	QDVYKGGIGTVPVGRVE
ERDPTNIKWGEAGAEYWE	LQDQVYKGGIGTVPVGRVE
ERDPTNIKWGE	PLQDQVYKGGIGTVPVGRVE
	RLPLQDQVYKGGIGTVPVGRVE
RVISAISAIDAMFVGMVNHIE	ETGVLLKPGMVT
KRVISAISAIDAPM	ETGVLLKPGMVT
RVISAISAIDAM	ETGVLLKPGMVT

(continued on next page)

Tableau 20: liste des protéines dont des séquences correspondent aux peptides associés à l'HSP70 [132].

Il semblerait que l'HSP70 s'associe donc à une large variété de peptides, préférentiellement avec des peptides d'environ 9 AA (8 à 26 AA) ayant une région hydrophobe et des résidus chargés positivement.

L'analyse des peptides associés au HSP est faite dans la majorité des cas par MALDI [132]. Une approche originale a été récemment publiée [133] pour l'identification des antigènes associés à l'HSP70 : les complexes HSP70-peptides purifiés à partir de cellule de cancer du sein sont identifiés par confrontation sur plaque vis-à-vis d'une banque peptidique produite de manière aléatoire par le phage M13.

L'analyse des séquences que nous avons obtenue est décevante car nous n'avons pas identifié de peptide cellulaire ou virale spécifique. Le séquençage s'est heurté à un problème de sensibilité : nous ne disposons plus que de quelques µg de peptides pour assurer ce séquençage ; il est possible que celui-ci n'ait retenu que des signaux issus d'espèces en mélange. L'identification d'espèces moléculaires par MALDI est facilitée par l'introduction d'une digestion trypsique et d'une matrice susceptible de retenir les résidus C-terminaux chargés positivement, issus de la digestion par la trypsine.

La pertinence des peptides identifiés reposerait sur leur capacité à entraîner une réponse immunitaire cellulaire comme pour le peptide isolé à partir de cellules infectées par le VSV [122]. Il est judicieux de tester la capacité de ces peptides à stimuler des lymphocytes en dosant la sécrétion d'interféron par exemple ainsi que leur capacité via les cellules dendritiques à déclencher une réponse lymphocytaire vis-à-vis du tissu ou des cellules dont les peptides sont issus [132]. Il pourrait aussi être intéressant de voir s'ils sont reconnus par l'immunité humorale des patients en testant la réactivité des sérum de patients vis-à-vis de ces peptides seuls et/ou complexés à l'HSP. Il a été ainsi montré une réactivité de sérum vis-à-vis de complexes calréticuline-épitopes de Ro60 chez 95-100% des patients ayant des anticorps anti-Ro et chez 0% chez ceux qui en sont dépourvus [117]. Dans l'infection par le VIH, le complexe Gagp24-gp96 est reconnu par les LT8 et LT4, alors que le peptide seul est faiblement reconnu [134]. On sait que les lysats de tissus tumoraux (riche en HSP70 et 90) sont capables d'induire la maturation des cellules dendritiques [135]. Des complexes HSP70-peptides purifiés à partir de cellules de mélanome, incubés avec des cellules dendritiques, permettent une stimulation efficace de LT 8 spécifique de l'antigène tyrosinase, même en l'absence de TNF α [136]. Dérivés de tissus sains les complexes HSP70-peptides ne déclenchent pas d'immunité alors qu'elle apparaît forte et spécifique lorsqu'ils sont dérivés de tissu tumoraux [137]. L'association d'antigènes avec l'HSP73 facilite la présentation *in vitro* et *in vivo* aux LT8, via les cellules dendritiques [138]. Il est intéressant de noter qu'une fois l'antigène cible identifié, on peut reconstituer *in vitro* les complexes HSP70-Ag qui déclencheront alors la même immunité cellulaire que les associations établies *in vivo* [139, 140]. On peut aussi créer des molécules hybrides comportant une partie d'HSP et une partie d'un antigène [141].

Les complexes sont capables aussi de jouer un rôle immunomodulateur en augmentant le taux de NK régulateurs. Ainsi, s'ils sont administrés avant le déclenchement de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), les complexes HSP70-peptides issus de cerveaux de souris avec EAE, préviennent cliniquement et histologiquement la maladie [88].

4. Rôle de NS3 dans l'émergence des peptides antigéniques

La pertinence de ces peptides que nous avons purifié, peut aussi être assurée par la responsabilité de la protéase à sérine NS3 dans leur apparition. En utilisant un inhibiteur synthétique spécifique de NS3 (BILN 2061, [65]) pendant la culture cellulaire, nous avons de nouveau purifié des complexes HSP70-peptides. Il est intéressant de noter, qu'en bloquant

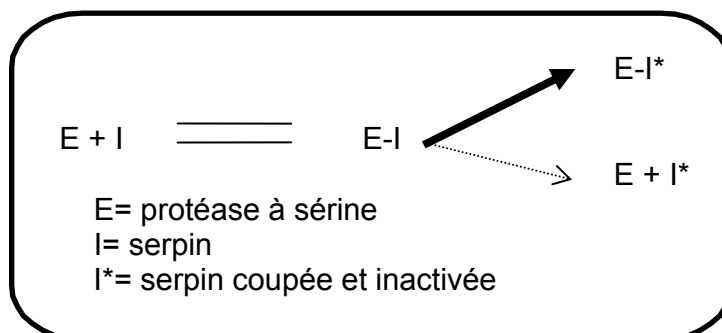
seulement cette protéase virale, on a diminué le stress cellulaire puisque l'expression d'HSP70 est nettement plus faible dans les cellules HepG2NT+BILN2061. L'analyse des peptides associés à l'HSP70, issus de ces cellules cultivées avec BILN2061, est en cours par les spectromètre de masse MALDI-TOF, LC-MS/MS.

BILN2061 est sans effet sur les protéases à sérine et à cystéine de l'hôte. Son action est dose dépendante sur la synthèse de l'ARN virale dès 3 jours de contact avec des cellules contenant des réplicons. Il est efficace sur les génotypes 1,2 et 3 [142]. Cet inhibiteur inhibe l'activité de coupure de NS3 vis-à-vis de tous les sites de clivage estimé par l'accumulation de NS3-NS5B dans les cellules cultivées avec BILN2061. On peut alors suggérer que cet inhibiteur puisse aussi bloquer l'activité protéolytique de NS3 vis-à-vis de protéines du soi et empêcherait ainsi la captation d'antigènes cryptiques par les HSP et leur présentation éventuelle au système immunitaire. Il aurait été intéressant de tester la réactivité des patients VHC vis-à-vis des lysats HepG2NT +BILN2061 afin de voir si elle était modifiée.

5. Potentiel protéolytique de NS3 vis-à-vis des protéines de l'hôte

NS3 a-t-elle la capacité de protéolyser des protéines cellulaires ? En contribuant à la résistance du VHC vis-à-vis des défenses immunitaires, NS3 interagit avec plusieurs protéines : RIG-1 (et bloque la voie de l'IFN) [143], TBK1 (bloque alors l'activation de l'IRF-3 et donc la voie de l'IFN) [144], CARDIF (permettant l'activation des promoteurs de l'IFN) [145]. NS3 clive la protéine TRIF (liée au Toll like recepteur 3) [146] et la protéine MAVS (protéine mitochondriale permettant la synthèse de l'IFN) (23). Il est certain qu'en étant situé dans le RE [39, 148], NS3 est en contact étroit avec des protéines en concentrations élevées (gel protéique) ce qui favorise des associations avec des substrats possibles. Douée d'une activité de type protéase à sérine, il était intéressant d'examiner son interaction avec le C1Inh, inhibiteur des protéases à serine (SERPIN). Nous connaissons bien cet inhibiteur dans le cadre de nos recherches sur l'angioedème héréditaire. Cette serpin se comporte comme un susbrat suicide vis-à-vis de sa protéase cible [149, 150]. Le site actif de la serpin imite le substrat naturel de la protéase et la bloque. On observe 2 sortes de produits issus de cette interaction serpin-protéase :

- Un complexe covalent et stable, résistant aux agents dénaturants ; il représente 90% des produits de l'interaction.
- Des produits de coupure de la serpin par la protéase, représentatifs de la serpin alors inactivée; cela se produit pour 10% des protéines C1Inh mises en jeu.



Le C1Inh est une glycoprotéine hautement glycosylée (45%) synthétisé en majorité par le foie, mais aussi les monocytes et les fibroblastes. Ses cibles principales sont les protéase du C1 (C1s et C1r), le facteur de Hageman et la kallikréine. En incubant la protéase NS3 et la serpin C1Inh, on voit nettement que NS3 est capable de couper C1Inh de développer des associations serpin-protéase et donc de l'inactiver. On a mis en évidence une liaison de type ester entre les 2 protéines grâce à l'hydroxylamine, liaison indispensable à la relation entre

une serpin et sa protéase cible. En analysant les séquences du C1Inh, on note un site possible de coupure par NS3 en situation N-terminale (séquence EGKVATT, annexe 2). On retrouve la présence de complexes de haut poids moléculaires contenant du C1Inh ; il pourrait s'agir de complexes inhibiteurs C1Inh-NS3 mais la masse estimée de ces complexes est supérieure à la somme des masses de NS3 et C1Inh. Il se peut que nous ne soyons pas dans un rapport stœchiométrique de 1 :1 ou en présence de formes oligomériques. La présence concomitante de NS3 et C1Inh dans ces complexes est bien montrée par la double immunoprécipitation qui montre aussi que l'interaction est possible dans la cellule HepG2NT. Si les 2 protéines sont capables de se complexer, C1Inh est donc capable d'inhiber la protéase NS3. Effectivement, en utilisant un test enzymatique avec un peptide chromogène cible de NS3, C1Inh est capable d'inhiber NS3 même si cette inhibition est partielle et plus faible que celle des anticorps anti-NS3.

Cette constatation biochimique correspond-elle à une réalité clinique et biologique chez les patients VHC ? Le dosage du C1Inh est normal chez les patients VHC [151]; on note uniquement un abaissement du C4 chez les patients avec une corrélation négative avec le taux de FR[151]. Sur le plan clinique, il n'est pas décrit que les patients VHC fassent particulièrement des angioedèmes bradykiniques (pathologies apparaissant entre autre chez les patients ayant un déficit acquis ou héréditaire en C1Inh). Enfin, on pourrait penser que l'association VHC et déficit en C1Inh favorise un tableau plus sévère des 2 maladies; le déficit en C1Inh étant très rare, il est difficile d'y répondre ; nous connaissons par le biais de notre travail (PHRC) sur l'angioedème un cas de patiente ayant eu un angioedème héréditaire et une hépatite C, et qui est malheureusement décédée rapidement de sa pathologie hépatique.

Nous avons cherché à vérifier le potentiel protéolytique de NS3 vis-à-vis du CYP 450 2D6 car cette protéine a des épitopes spécifiquement associés avec l'hépatite auto-immune associée au VHC. En effet il existe une réactivité différente des Ac anti-LKM1 entre les patients ayant une HAI-VHC et ceux ayant une HAI non virale [152]. Les épitopes du CYP 450 2D6 seraient confinés à la partie C terminale de la molécule [153]. L'incubation de NS3 et du CYP 450 2D6 semblerait développer une coupure du cytochrome ; cette coupure semble toutefois être faible car seul le Western Blot met en évidence une diminution de la bande correspondant au CYP 450 2D6. La technique que nous avons utilisée manque de sensibilité ; la protéine NS3 n'exprime pas une forte activité protéolytique et coupe ses substrats avec des rendements faibles, puisqu'il faut réaliser des incubations longues (au moins une semaine) pour examiner son activité. Cela peut s'expliquer par le fait que NS3 a du mal à accéder au site de coupure, soit par une mauvaise qualité de notre protéine purifiée. L'analyse des séquences du CYP 450 2D6 (annexe 3) montre un site de coupure possible à la position 159 (P1). Il serait intéressant d'analyser les produits de protéolyse du cytochrome par NS3 afin de voir s'ils laissent les dits épitopes spécifiques des HAI (examen par MALDI à partir de bandes de gel par exemple, après une digestion par trypsine). La réactivité de sérums de patients ayant une HAI-VHC associée à des Ac anti-LKM1 pourrait être testée vis-à-vis de ces produits.

Conclusion et perspectives

Les résultats des différentes expériences rapportés dans ce travail nous ont permis de remplir nos objectifs avec les points suivants

1. Le stress induit par l'infection chronique par le VHC se traduit chez les patients par une surexpression de l'HSP 70 dans les hépatocytes et dans le sang ; cette expression périphérique de l'HSP70 est associée à l'apparition d'une auto-immunité anti-HSP. Le développement de la surexpression d'HSP et d'Ac anti-HSP semble être associé à la réponse thérapeutique à l'interféron, mais surtout à la dysimmunité clinique qui accompagne l'hépatite C chronique. C'est la première fois que les anticorps anti-HSP sont dosés dans le contexte de la dysimmunité associée au VHC ; de plus aucune étude n'a été conduite avec des données clinimétriques de l'hépatite C.
2. A l'échelon cellulaire, nous avons montré que la présence d'une partie de la polyprotéine virale dans des cellules hépatocytaires se traduisait par un stress, objectivé par l'accumulation de protéines chaperonnes dans les lysats.
3. Ce stress cellulaire se traduit non seulement par une augmentation du taux d'HSP, mais aussi par la présence de complexes HSP-peptides inhabituels doués d'antigénicité et qui pourraient être immunogènes.
4. Ce stress cellulaire semble être en partie lié à l'activité protéolytique de la protéase NS3 qui est non seulement essentielle à la réplication virale mais aussi fortement impliquée dans le stress cellulaire induit par l'infection virale. C'est la première fois qu'est mis en évidence le rôle direct d'une protéase virale dans le développement du stress cellulaire secondaire à une infection virale.
5. NS3 semble exercer une activité protéolytique vis-à-vis de plusieurs protéines cellulaires substrats dont la sous-unité 2D6 du cytochrome P450, dont des épitopes sont impliqués dans l'hépatite auto-immune associée au VHC. NS3 est donc susceptible de favoriser, par son activité protéase, l'émergence d'épitopes nouveaux.
6. L'interaction de NS3 avec C1Inh suggère un possible contrôle cellulaire de la protéase, qui serait favorisé par l'IFN, cytokine connue pour augmenter la synthèse de C1Inh.

Ce travail amène de nouvelles questions et de nouvelles idées à explorer :

- 1- Sur une plus large cohorte de patients présentant une dysimmunité associée au VHC et classé selon les critères d'activité MétaVir, des corrélats entre les autoanticorps anti-HSP et différentes données clinimétriques pourront être recherchés par analyses univariées et multivariées ; la valeur prédictive positive de ces autoanticorps pour les maladies auto-immunes associées au VHC devra être confirmée.
- 2- Sur une plus large cohorte de patients traités par l'interféron, l'intérêt prédictif des autoanticorps sur la réponse thérapeutique devra être vérifiée.
- 3- Le potentiel immunogène des peptides isolés des cellules transfectées avec la partie N-terminale de la polyprotéine virale devra être vérifié: notamment en testant l'immunité adaptative (Ac et réponses T) des patients VHC avec ou sans maladies auto-immunes associées : tests de prolifération cellulaire, tests ELISA vis-à-vis des peptides seuls et vis-à-vis des complexes.
- 4- Les produits de coupure du CYP 450 2D6 seront testés vis-à-vis des anticorps anti-LKM1 associés à l'HAI associée au VHC. Ces produits de coupure devront être identifiés.

- 5- Nous avons utilisé un modèle ne comprenant pas la partie N-terminale de la polyprotéine virale, privant ainsi NS3 de son cofacteur NS4A et de ses substrats naturels viraux. L'intérêt d'utiliser la partie N-terminale était de favoriser la localisation de NS3 plutôt dans le RE où elle était ainsi en contact étroit avec plusieurs protéines potentiellement substrats ; le deuxième intérêt était de favoriser l'activité protéolytique de NS3 vis-à-vis des protéines cellulaires en la privant de ses substrats naturels. Il serait intéressant de comparer le stress cellulaire et l'émergence de peptides dans des cellules transfectées par des constructions exprimant la partie C-terminale : ce type de construction est disponible au laboratoire ainsi qu'une construction avec le site catalytique de NS3 muté Ser/Ala, qui pourrait être utilisé comme contrôle négatif (à la place de l'inhibiteur BILN). Enfin, pour se rapprocher le plus possible des conditions naturelles, on pourrait étudier des transfectants avec des réplicons.
- 6- Les données de structure et les propriétés de C1Inh pourraient être développées par la création d'un inhibiteur de la protéase virale. La question se pose déjà si l'administration de concentré de C1Inh à de patients VHC pourrait montrer une efficacité sur l'état de leur infection virale (Bérinert^R, laboratoire Behring, utilisé comme traitement substitutif dans les angioedèmes héréditaires par déficit en C1Inh).

Bibliographie

- 1 - **Pawlotsky JM (2002)**. Le virus de l'Hépatite C. *Médecine/Sciences*; 18: 303-314.
- 2 - **Poynard T, Yen MF, Ratziu V, Lai CL (2003)**. Viral Hepatitis C. *The Lancet*; 362: 2095-2100.
- 3 - **Lauer G, and Walker B (2001)**. Hepatitis C Virus Infection. *N. Engl. J. Med*; 345: 41-51.
- 4 - **Pol S, Zylberberg H (2000)**. Formes cliniques et évolution de l'hépatite C. *La Revue du praticien*; 50: 1083-1088.
- 5- **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989)**. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.
- 6 - **Rosenberg S (2001)**. Recent Advances in the Molecular Biology of Hepatitis C Virus. *La Revue du praticien*; 50: 1083-1088.
- 7- **Koch J.O and Bartenschlager R (1997)**: Determinants of Substrate Specificity in the NS3 Serine Proteinase of the Hepatitis C Virus . *Virology* ; 237: 78-88
- 8- **Bianchi-E, Steinkühler-C, Taliani-M,Urbani-A De Francesco-R, and Pessi-A (1996)**. Synthetic Depsipeptide Substrates for the Assay of human Hepatitis C Virus Protease. *Anal Bioch* ; 237: 239-244
- 9- **Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D (2000)**. Subcellular localization, stability, and trans cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline regulated cell lines. *J Virol*; 74: 2293-2304;
- 10- **Steinkuhler-C; Urbani-A; Tomei-L; Biasioi-G; Sardana-M; Bianchi-E; Pessi-A; De-Francesco-R (1996)**. Activity of purified Hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. *J Virol*; 70: 6694-700
- 11- **Hedsrom L, Szilagyi L, Rutter WJ (1992)**. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science*; 255: 1249-1253
- 12- **Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW, Adachi T, Hostomska Z (1996)**. The Crystal Structure of Hepatitis C Virus NS3 Proteinase Reveals a Trypsin-like Fold and a Structural Zinc Binding Site. *Cell* ; 87: 331-342
- 13- **Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR (1998)**. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure*; 6: 89-100
- 14- **Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR,**

- Thomson JA (1996).** Crystal Structure of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Domain Complexed with a Synthetic NS4A Cofactor Peptide. *Cell*;87: 343-355
- 15- **Rice CM.** 1996. In : *Fields Virology*, B.N. Fields et al, eds, Lipincott-Raven Philadelphia: 931-59
- 16- **[Mercer DE](#), [Schiller DE](#), [Elliott JF](#), [Douglas DN](#), [Hao C](#), [Rinfret A](#), [Addison WR](#), [Fischer KP](#), [Churchill TA](#), [Lakey JR](#), [Tyrrell DL](#), [Kneteman NM](#) (2001).** Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*; 7: 927-933
- 17 – **Lohmann V, Körner F, Koch JO, Herian U, Theilmann L, Bartenschlage R (1999).** Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* 285: 110-113
- 18- **Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM (2006).** Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci*; 103: 3805-3809
- 19 - **Racanelli V, and Rehermann B (2003).** Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends in Immunology*; 24: 456-464.
- 20 - **Neumann-Haefelin C, Blum H, Chisari F, Thimme R (2005).** T cell response in hepatitis C virus infection. *J. Clinical Virology*; 32: 75-85.
- 21 - **Sun J, Li K, Shata M, and Chan TS (2004).** The immunologic basis of hepatitis C infection. *Current Opinion Gastroenterol*; 20: 598-602.
- 22 - **Zarski JP, Souvignet C (2002).** Physiopathology of HCV infection. *Gastroenterol.Clini. Biol*; 26: 154-162
- 23 - **Hahn Y (2003).** Subversion of immune responses by hepatitis C virus immunomodulatory strategies beyond evasion. *Current Opinion Immunol*; 15: 443-449.
- 24 - **Eisen-Vandervelde A, Yao ZQ, and Hahn Y (2004).** The molecular basis of HCV-mediated immune dysregulation. *Clinical Immunology*; 111: 16-21.
- 25- **Obermayer-Straub and Manns M (2001).** Hepatitis C and D, Retroviruses and Autoimmune Manifestations. *J. Autoimmun*; 16: 275-285.
- 26 - **Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti ,V, Yamamoto AM, Camproux AC, Hausfater P, Musset L, Veyssier P, Raguin G, Piette JC, for the Germivc. (2005).** Extrahepatic Manifestations Associated with Hepatitis C Virus Infection – A prospective Multicenter Study of 321 Patients. *Medicine*; 79: 47-56.
- 27 - **Trendelenburg M, and Schifferli J (2003).** Cryoglobulins in chronic hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol*; 133: 153-155.
- 28- **Zuckermann E, Slobodin G, Kessel A, Sabo E, Yeshurin D, Halas K, and Toubi E (2002).** Peripheral B-cell CD5 expansion and CD81 overexpression and their association with

disease severity and autoimmune markers in chronic hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol.*; 128: 253-358.

29 - **Strassburg C, Vogel A, Manns M (2003)**. Autoimmunity and hepatitis C. *Autoimmun. Rev.*; 2: 322-331.

30 - **Vento S, Cainelli F. (2004)**. Is there a role for viruses in triggering autoimmune hepatitis? *Autoimmun. Rev.*; 3: 61-69.

31- **Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos D, Muratori L, Bianchi F, Williams R, Mieli-Vergani G, and Vergani D (2003)**. Cytochrome P4502D6₁₉₃₋₂₁₂: A New Immunodominant Epitope and Target of Virus/Self Cross-Reactivity in Liver Kidney Microsomal Autoantibody Type 1-Positive Liver Disease. *J. Immunol.*; 170: 1481-1489.

32 - **Zachou K, Rigopoulou E, and Dalekos G (2004)**. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J. Autoimmune Dis.*; 1: 1-17.

33-**Gregorio G, Choudhuri K, Ma Y, Pensati P, Iorio R, Grant P, Garson J, Bogdanos D, Vegnente A, Mieli-Vergani G, and Vergani D (2003)**. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol.*; 133: 404-413

34 - **Vogel A, Manns M, Strassburg C. (2002)**. Autoimmunity and viruses. *Clin. Liver Dis.*; 6: 451-465.

35 – **Di Rosa F, Barnaba V. (1998)**. Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to immunity. *Immunol. Rev.*; 164: 17-27.

36- **Rose NR (2001)**. Infection, mimics, and autoimmune disease. *J Clin Invest.*; 107: 943-944

37- **Liberman E, Fong LY, Selby M, Choo QL, Cousens L, Houghton M, and Yen B (1999)**. Activation of the grp78 and grp94 Promoters by Hepatitis C Virus Envelope Protein. *J. Virol.*; 73: 3718-3722.

38 - **Kuramitsu Y, and Nakamura K (2005)**. Current progress in proteomic study of hepatitis C virus- related human hepatocellular carcinoma. *Expert Rev. Proteomics.*; 2: 589-601.

39 - **Wölk B, Sansonno D, Kraüsslich H, Dammacco F, Rice C, Blum H, and Moradpour D (2000)**. Subcellular Localization, Stability, and trans-Cleavage Competence of the Hepatitis C Virus NS3-NS4A Complex Expressed in Tetracycline-Regulated Cell Lines. *J. Virol.*; 74: 12293-2304.

40 - **Srivastava P (2004)**. Heat shock proteins and immune response: methods to madness. *Methods* ; 32: 1-2.

41 - **Srivastava P (2002)**. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Rev. Immunol* ; 2: 185-194.

- 42 - **Pockley A (2003)**. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* ; 362 (9382): 469-476.
- 43 - **Mandal K, Jahangiri, and Xu Q (2004)**. Autoimmunity to heat shock proteins in atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*; 3: 31-37.
- 44 - **Gaston J (2002)**. Heat shock proteins and innate immunity. *Clin. Exp. Immunol* ; 127: 1-3.
- 45 - **Tsan MF, and Gao B (2004)**. Cytokine function of heat shock proteins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*; 286: C739-C744.
- 46 - **Asea A (2005)**. Stress Proteins and Initiation of Immune Response: Chaperokine activity of Hsp72. *Exerc. Immunol. Rev*; 11: 34-45.
- 47 - **Hilf N, Singh-Jasuja H, and Schild H (2002)**. The heat shock protein Gp96 links innate and specific immunity. *Int. J. Hyperthermia*; 18: 521-533.
- 48 - **Gullo C, and Teoh G (2004)**. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Int. Immunol. Letters*; 94: 1-10.
- 49 - **Nardai G, Végh E, Prohaszka Z, and Csermely P (2003)**. Chaperone-related immune dysfunction : an emergent property of distorted chaperone networks. *Trends in Immunology*; 27: 74-79.
- 50- **[Sastry S](#), [Linderoth N](#) (1999)**. Molecular mechanisms of peptide loading by the tumor rejection antigen/heat shock chaperone gp96 (GRP94). *J Biol Chem*; 274: 12023-12035
- 51 - **Binder R, Vatner R, and Srivastava P (2004)**. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissu Antigens* ; 64: 442-451.
- 52 - **Pockley A (2001)**. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents. *Expert Rev. Mol. Med*; 21 September 2001: 1-20.
- 53 - **Todryk S, Gough M, and Pockley A (2003)**. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunology*; 110: 1-9.
- 54 - **Michils A, Dutry D, Zegers de Beyl V, Rimmelink M, Maertelaer V, and Rocmans P (2002)**. Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation to Heat Shock Protein-70 Derived from Autologous Lung Carcinoma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*; 166: 749-753.
- 55 - **Wang Y, Whittall T, McGovan E, Younson J, Kelly C, Bergmeier L, Singh M, and Lehner T (2005)**. Identification of Stimulating and Inhibitory Epitopes within the Heat Shock Protein 70 Molecule That Stimulate Cytokine Production and Maturation of Dendritic Cells. *J. Immunol*; 174: 3306-3316.
- 56 - **Radons J, and Multhoff G (2005)**. Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exerc. Immunol. Rev*; 11: 17-33.

- 57- **Baker-LePain J, Reed R, and Nicchitta C (2003)**. ISO: a critical evaluation of the role of peptides in heat-shock/chaperone protein-mediated tumor rejection. *Current Opinion Immunol* ; 15: 89-94.
- 58- **Koch JO, Koch JO, Lohmann V, Herian U, Bartenschlager R (1996)**. In vitro studies on the activation of the hepatitis C virus NS3 proteinase by the NS4A cofactor. *Virology* ; 221:54-66.
- 59- **Drouet C, Bouillet L, Csopaki F, Colomb M (1999)**. Hepatitis C virus NS3 serine protease interacts with the serpin C1 inhibitor. *FEBS lett* ; 458 :415-418
- 60- **Thibeault D, Bousquet C, Gingras R, Lagace L, Maurice R, White PW, Lamarre D (2004)**. Sensitivity of NS3 serine proteases from hepatitis C virus genotypes 2 and 3 to the inhibitor BILN 2061. *J Virol*; 78: 7352-7359
- 61- **Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, and the European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome (2002)**. Classification criteria for Sjögren's syndrome; a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* ; 61:554-8
- 62- **Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al (1982)**. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*;25:1271-7
- 63- **Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C (1997)**. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:1200-5
- 64- **Vinci G, Lynch NJ, Duponchel C, Lebastard TM, Milon G, Stover C, Schwaeble W, Tosi M (2002)**. In vivo biosynthesis of endogenous and of human C1 inhibitor in transgenic mice: tissue distribution and colocalization of their expression. *J Immunol*.169:5948-54
- 65- **Lamarre D, Anderson P, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, et al (2003)**. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*; 426: 186-189
- 66- **Njemini R, Demanet C, and Mets T (1997)**. Determination of intracellular heat shock protein 70 using a newly developed cell lysate immunometric assay. *J.Immunol. Methods*; 274:271-279.
- 67- **Maehara Y, Oki E, Abe T, Tokunaga E, Shibahara K, Kakeji Y, Sugimachi K (2000)**. Overexpression of the heat shock protein HSP70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer. *Oncology*;58:144-51
- 68- **Peng P, Menoret A, and Srivastava P (1997)**. Purification of immunogenic heat shock protein 70-peptide complexes by ADP-affinity chromatography. *J.Immunol. Methods*; 204:13-21.
- 69- **Menoret A (2004)**. Purification of recombinant and endogenous HSP70s. *Methods*; 32:7-12.

- 70- **Rada A, Tonino P, Anselmi G, Strauss M (2005)**. Is hypothermia a stress condition in HepG2 cells? Expression and localization of Hsp70 in human hepatoma cell line. *Tissue and Cell*; 37: 59-65.
- 71- **Zhu X, Li C, Lang Z, Gao G, Tien P (2004)**. Significant correlation between expression level of HSP gp 96 and progression of hepatitis B virus induced diseases. *World J. Gastroenterol*; 10: 1141-1145.
- 72- **Lim SO, Park SG, Yoo JH, Park YM, Kim HJ, Janj KT, Cho JW, Yoo BC, Jung GH, Park CK (2005)**. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J. Gastroenterol*; 11: 2072-2079.
- 73- **Torrenteguy C, Frasson A, Zerwes F, Winnikov E, da Silva V, Menoret A, Bonorino C (2006)**. Inducible heat shock protein 70 expression as a potential predictive marker of metastasis in breast tumors. *Cell Stress Chaperones*; 11: 34-43
- 74- **Yamazaki K, Nguyen T, and Podack E (1999)**. Cutting Edge: Tumor Secreted Heat Shock-Fusion Protein Elicits CD8 Cells for Rejection. *J. Immunol*; 163: 5178-5182.
- 75- **Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Lizuza N, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka K, and Nakamura K (2003)**. Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomic*; 3: 2497-2493
- 76- **Pockley A, Shepard J, Corton J (1998)**. Detection of heat shock Protein 70 (Hsp 70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol. Invest*; 27: 367-377.
- 77- **Njemini R, Lambert M, Demanet C, Mets T (2004)**. Inflammatory status as an important determinant of heat shock protein 70 serum concentrations during aging. *Biogerontology*; 5: 31-38.
- 78- **Njemini R, Lambert M, Demanet C, Mets T (2003)**. Elevated Serum Heat-Shock Protein 70 Levels in Patients with Acute Infection : Use of an optimized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Scand J Immunol*; 58: 664-669.
- 79- **Dybdahl B, Slørdahl S, Waage A, Kierulf P, Espevik T, and Sundan A (2005)**. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart*; 91: 299-304.
- 80- **Ripley B, Isenberg D, and Latchman D (2001)**. Elevated Levels of the 90 kDa Heat Shock in SLE Correlate with Levels of IL-6 and Auto antibodies to hsp90. *J. Autoimmun*; 17: 341-346.
- 81- **Wallin R, Lundqvist A, Moré S, von Bonin A, Kiessling R, and Ljunggren H-G (2001)**. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Traffic*; 2: 690-697.
- 82- **Koxsis J, Prohaszka Z, Biró A, Füst G, Bánhegyi D (2003)**. Elevated level of antibodies against 70kDa heat shock proteins in the sera of patients with HIV infection. *J. Med. Virol*; 71: 480-482.

83- **Fukuda Y, Yotsuyanagi H, Ooka S, Sekine T, Koike J, Takano T, Suzuki M, Itoh F, Nishioka K, Kato T.** Identification of a new autoantibody in patients with chronic hepatitis. *Hum Immunol.* 2004; 65:1530-8.

84- **Shingai R, Maeda T, Onishi S, Yamamoto Y (1995).** Autoantibody against 70 kD heat shock protein in patients with autoimmune liver diseases. *J. Hepatol;* 23: 382-390.

85- **Direskeneli H, and Saruhan-Direskeneli G (2003).** Review: The Role of Heat Shock Proteins in Behçet's Disease. *Clin. Exp. Rheumatol;* 21:44-48.

86- **Puga Yung G, Le T, Roord S, Prakken B, and Albani S (2003).** Heat shock proteins (HSP) for immunotherapy of rheumatoid arthritis (RA). *Inflamm.res;* 52: 443-451.

87- **Munari L, Charchat S, Rodrigues L, Alberto von Muhlen C, Bau A, Lavinsky L, and Bonorino C (2000).** An ELISA serum assay for autoantibodies to HSP70 in immune-mediated hearing loss. *J.Immunol. Methods ;* 283: 155-161.

88- **Chauhan S, Tripathy N, Sinha N, Singh M, and Nityanand S (2004).** Cellular and humoral immune responses to mycobacterial heat shock protein-65 and its human homologue in Takayasu's arteritis. *Clin. Exp. Immunol ;* 138: 547-553.

89- **de Smet M, Ramadan A (2001).** Circulating antibodies to inducible heat-shock protein 70 in patients with uveitis. *Immunology;* 9: 85-92.

90- **Qin HY, Mahon J, Atkinson M, Chaturvedi P, Lee-Chan E, Singh B (2003).** Type 1 diabetes alters anti-hsp90 autoantibody isotype. *J. Autoimmun;* 20: 237-245.

91- **Conroy SE, Faulds GB, Williams W, Latchman DS, Isenberg DA.** Detection of autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Br J Rheumatol.* 1994; 33:923-6.

92- **Kenderov A, Minkova D, Mihailova D, Giltiay N, Kyurkchiev S, Kerayov I, Kazatchkine M, Kaveris S, and Pashov A (2002).** Lupus-specific kidney deposits of HSP90 are associated with altered IgG idiotypic interactions of anti-HSP90 autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol;* 129: 169-176.

93- **Dieudé M, Senécal JL, and Raymond Y (2004).** Induction of Endothelial Cell Apoptosis by Heat-Shock Protein 60-Reactive Antibodies From Anti-Endothelial Cell Autoantibody-Positive Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Arthritis Rheum ;* 50: 3221-3231.

94- **Villalobos-Hurtado R, Sanchez-Rodriguez SH, Avalos-Diaz E, Herrera-Esparza R, and Herrera-Esparza R (2003).** Possible role of Hsp70 in autoantigen shuttling to the dermo-epidermal junction in systemic lupus erythematosus. *Reumatismo;* 55: 155-158.

95- **Vassilopoulos D, and Calabrese L. (2005).** Extrahepatic immunological complications of hepatitis C virus infection. *Aids;* 19: S123-S127.

- 96- **Ramos-Casals M, Jara LJ, Medina F, Rosas J, Calvo-Alen J, Mana J, Anaya JM, Font J; The Hispamec Study Group. (2005).** Systemic autoimmune diseases co-existing with chronic hepatitis C virus infection (the HISPAMEC Registry): patterns of clinical and immunological expression in 180 cases. *J. Intern. Med*; 257: 549-557.
- 97- **Stroffolini T, Colloredo G, Gaeta G, Sonzogni A, Angeletti S, Marignani M, Pasquale G, Venezia G, Craxi A, and Almasio P (2004).** Does an “autoimmune” profile affect the clinical profile of chronic hepatitis C? An Italian multicentre survey. *J Viral Hepat*; 11: 257-262.
- 98- **Muratori P, Muratori L, Stroffolini T, Pappas G, Terlizzi P, Ferrari R, Loffreda S, Cassani F, Rapicetta M, Guadagnino V, Bianchi F, and Lenzi M (2003).** Prevalence of non-organ specific autoantibodies in HCV-infected subjects in the general population. *Clin. Exp. Immunol*; 131: 118-121.
- 99- **Wasmuth H, Stolte C, Geier A, Dietrich C, Gartung C, Lorenzen J, Matern S, and Lammert F (2004).** The presence of non-organ-specific autoantibodies is associated with a negative response to combination therapy with interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *BMC Infect Dis*; 4: 1-11.
- 100- **Sène D, Limal N, and Cacoub P. (2004).** Hepatitis C Virus-Associated Extrahepatic Manifestations: A Review. *Metab Brain Dis*; 19: 357-381.
- 101- **Goral J, Shenoy S, Mohanakumar T, and Clancy Jr J (2002).** Antibodies to 70kD and 90kD heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol*; 127: 553-559.
- 102- **Muratori P, Muratori L, Guidi M, Granito A, Susca M, Lenzi M and Bianchi F (2005).** Clinical Impact of Non-Organ-Specific Autoantibodies on the Response to Combined Antiviral Treatment in Patients with Hepatitis C. *Clin. Infect. Dis*; 40: 501-507.
- 103- **Wu YY, Hsu TC, Chen TY, Liu TC, Liu GY, Lee YJ, and Tsay GJ (2002).** Proteinase 3 and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) are major autoantigens in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin. Exp. Immunol*; 128: 347-352.
- 104- **Omagari K, Ohba K, Kadokawa Y, Hayashida K, Isomoto H, Takeshima F, Mizuta Y, Murata I Kohno S (2003).** Anti-extractable nuclear antigens (ENA) antibodies in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon. *Autoimmunity*; 36: 269-273.
- 105- **De Rosa FG, Pucillo LP, Coviello R, Pirro MR, Fiaschetti P, Candela M, Gabrielli A, Lagana B, Fiorilli M, and Caato M (2002).** Influence of age and autoimmunity on liver disease in HCV-associated type II mixed cryoglobulinemia. *Hum Immunol*; 63: 751-757
- 106- **Quiroga JA, Pardo M, Navas S, Martin J, Carreno V (1996).** Patterns of immune responses to the host encoded GOR and hepatitis C virus core derived epitopes with relation to hepatitis C viremia, genotypes and liver disease severity. *J Infect Dis*; 173: 300-305

- 107- **Feld JJ, Hoofnagle JH (2005)**. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*; 436: 967-972
- 108- **Garrido A, Lepe JA, Guerrero FJ, Palomo S (2000)**. Serologic response against hepatitis C virus as a predictive factor for the treatment with interferon. *Enferm Inec Microbiol Clin*; 18: 512-515
- 109- **Santomenna L, and Colberg-Poley A (1990)**. Induction of Cellular hsp70 Expression by Human Cytomegalovirus. *J. Virol*; 64:2033-2040.
- 110- **Wainberg Z, Oliveira M, Tao Y, and Brenner B (1997)**. Modulation of Stress Protein (hsp27 and hsp70) Expression in CD4+ Lymphocytic Cells Following Acute Infection with Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Virology*; 233:364-373
- 111- **Kotsiopriftis M, Tanner J, and Alfieri C (2005)**. Heat shock Protein 90 Expression in Epstein-Barr Virus-Infected B Cells Promotes $\gamma\delta$ T-Cell Proliferation In Vitro. *J. Virol*; 79:7255-7261.
- 112- **Waxman L, Whitney M, Pollok B, Kuo L, and Darke P (2001)**. Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 98: 13931-13935.
- 113- **Choi YW, Tan YJ, Lim S, Hong W, and Goh PY (2004)**. Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *BBRC*; 318:514-519.
- 114- **Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Allesio C, Galdiero M, Finamore E, D'Isanto M, Peluso L, Del Vecchio Blanco C, Loguercio C (2004)**. Heat shock protein 27 expression in patients with chronic liver damage. *Immunobiology*; 209: 729-735
- 115- **Eggleton P (2003)**. Stress protein-polypeptide complexes acting as autoimmune triggers. *Clin. Exp. Immunol* ; 134: 6-8.
- 116- **Purcell A, Todd A, Kinoshita G, Lynch T, Keech C, Gething M, and Gordon T (2003)**. CD91 is a Common Receptor for Heat Shock Proteins gp96, hsp90, hsp70, and Calreticulin. *Clin. Exp. Immunol*; 132: 193-200.
- 117- **Staikou E, Routsias J, Makri A, Terzoglou A, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Panayotou H, and Tzioufas A (2003)**. Calreticulin binds preferentially with B cell linear epitopes of Ro60 kD autoantigen, enhancing recognition by anti-Ro60 kD autoantibody. *Clin. Exp. Immunol*; 134: 143-150.
- 118- **Millar D, Garza C, Odermatt B, Elford A, Ono N, Li Z, and Ohashi P (2003)**. Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nat. Med*; 9: 1469-1476.
- 119- **Auger I, and Roudier J (2005)**. Interaction Between HSP73 and HLA-DRB1* 0401. *Immunologic Research* ; 31: 261-266.

- 120- **Zabrecky J, and Sawlivich W (2004)**. Purification of the heat shock protein, gp96, from natural sources. *Methods*; 32:3-6.
- 121- **Przepiorka D, and Srivastava P (1998)**. Heat shock protein-peptide complexes as immunotherapy for human cancer. *Mol. Med.Today* ; 4: 478-484
- 122- **Nieland T, Tan A, Monnee-Van Muijen M, Koning F, Kruisbeek A, and van Bleek G (1996)**. Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96 / GRP94. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA- Immunology*; 93:6135-6139.
- 123- – **Meng SD, Song J, Rao Z, Tien P, Gao G (2002)**. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *J.Immunol. Methods*; 264:29-35.
- 124- **Peng P, Ménoret A, and Srivastava P (1997)**. Purification of immunogenic heat shock protein 70-peptide complexes by ADP-affinity chromatography. *J.Immunol. Methods*; 204:13-21.
- 125- **Vanaja DK, Grossman ME, Celis E, Young CY (2000)**. Tumor prevention and antitumor immunity with heat shock protein 70 induced by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate cells. *Cancer Res*; 60: 4714-4718
- 126- **Meng SD, Gao T, Gao G, and Po T (2001)**. HBV-specific peptide associated with heat-shock protein gp96. *Lancet*; 357: 528-529.
- 127- **Bolt G ((2001)**. The measles virus (MV) glycoproteins interact with cellular chaperones in the endoplasmic reticulum and MV infection upregulates chaperones expression. *Arch Virol*; 146: 2055-2068
- 128- **Xu Z, Jensen G, Yen TS (1997)**. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J Virol*; 71: 7387-7392
- 129-**Laquerre S, Anderson DB, Argnni R, Gloriosco JC (1998)**. Herpès simplex virus type 1 glycoprotein B requires a cysteine residue at position 633 for folding, processing, and incorporation into mature infectious virus particles. *J Virol*; 72: 4940-4949
- 130- **Mirazimi A, Svensson L (2000)**. ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *J Virol*; 74: 8048-8052
- 131-**Xu A, Bellamy AR, Taylor JA (2000)**. BiP (GRP78) and endoplasmin (GRP94) are induced following rotavirus infection and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. *J Virol*; 72: 9865-9872
- 132- **Grossmann M, Madden B, Gao F, Pang YP, Carpenter J, McCormick D, and Young C (2004)**. Proteomics shows Hsp70 does not bind peptide sequences indiscriminately in vivo. *Exp. Cell. Res*; 297: 108-117.

- 133- **Arnaiz B, Madrigal-Estebas L, Todryk S, James TC, Doherty DD, Bond U (2006).** A novel method to identify and characterise peptide mimotopes of heat shock protein 70-associated antigens. *J Immune Based Ther Vaccines* ; 41:2
- 134- **SenGupta D, Norris P, Suscovich T, Hassan-Zahraee M, Moffett H, Trocha A, Draenert R, Goulder P, Binder R, Levey D, Walker B, Srivastava P, and Brander C (2004).** Heat Shock Protein-Mediated Cross-Presentation of Exogenous HIV Antigen on HLA Class I and Class II. *J. Immunol*; 173: 1987-1993
- 135- **Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, Basu S, Srivastava P , and Bhardwaj N (2001).** Primary Tumor Tissue Lysates Are Enriched in Heat Shock Proteins and Inducer the Maturation of Human Dendritic Cells. *J. Immunol*; 167: 4844-4852.
- 136- **Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Hutzler P, Kuppner M, Roos M, Kremmer E, Asea A, Calderwood S, and Issels R (2001).** Tumor-Derived Heat Shock Protein 70 Peptide Complexes Are Cross-Presented by Human Dendritic Cells. *J. Immunol*; 169: 5424-5432.
- 137- **Udono H, and Srivastava P (1994).** Comparison of Tumor-Specific Immunogenicities of Stress-Induced Proteins gp96, hsp 90, and hsp70. *J. Immunol*; 152: 5398-5403.
- 138- **Kammerer R, Stober D, Riedl P, Oehninger C, Schirmbeck R, and Reimann J (2002).** Noncovalent Association with Stress Protein Facilitates Cross-Priming of CD8⁺ T Cells Antigens by Dendritic Cells. *J. Immunol*; 168: 108-117.
- 139- **Blachere N, Li Z, Chandawarkar R, Suto R, Jaikaria N, Basu S, Udono H, and Srivastava P (1997).** Heat Shock Protein-Peptide complexes, Reconstituted In Vitro, Elicit Peptide-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response and Tumor immunity. *J. Exp. Med*; 186: 1315-1322.
- 140- **Li Z (2004).** In vitro reconstitution of heat shock protein-peptide complexes for generating peptide-specific vaccines and infectious diseases. *Methods*; 32: 25-28.
- 141- **Udono H, Saito T, Ogawa M, and Yui Y (2004).** HSP-antigen fusion and their use for immunization. *Methods*; 32: 21-24.
- 142- **Thibeault D, Bousquet C, Gingras R, Lagacé L, Maurice R, White P, and Lamarre D (2004).** Sensitivity of Serine Proteases from Hepatitis C Virus Genotypes 2 and 3 to the Inhibitor BILN 2061. *J. Virol*; 78: 7352-7359.
- 143- **Foy E, Sumpter Jr R, Loo YM, Johnson C, Wang C, Fish P, Yoneyama M, Fujita T, Lemon S, and Gale M (2005).** Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*; 102: 2286-2291.
- 144- **Otzuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T, and Omata M (2005).** Interaction Between the HCV NS3 Protein and the Host TBK1 Protein Leads to Inhibition of Cellular Antiviral Responses. *Hepatology*; 41: 1004-1012.

- 145- **Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour M, Bartenschlager R, Tschopp J (2006)**. Cardif: A Protein Central to Innate Immunity is Inactivated by the HCV NS3 Serine Protease. *Hepatology*; 43: 615-617.
- 146- **Li K, Foy E, Ferreon J, Nakamura M, Ferreon A, Ikeda M, Ray S, Gale M, and Lemon S (2005)**. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*; 102: 2292-2297.
- 147- **Li XD, Sun L, Seth R, Pineda G, and Chen ZJ (2005)**. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*; 102: 17717-17722.
- 148- **Mottola G, Cardinali G, Ceccacci A, Trozzi C, Bartholomew L, Torrisi M, Pedrazzini E, Bonatti S, and Migliaccio G (2002)**. Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins Are Localized in a Modified Endoplasmic Reticulum of Cells Expressing Viral Subgenomic Replicons. *Virology*; 293: 31-43.
- 149- **Wright-H.T (1996)**. The structural puzzle of how serpin serine proteinase inhibitors work. *BioEssays*; 18: 453-464
- 150- **Arlaud-G.J, Reboul-A, Si-R.B And Colomb-M.G(1979)**. Interaction of C1-Inhibitor with the C1r And C1s Subcomponents In Human C1. *Biochim Biophys Acta*; 576: 151-162
- 151- **Dumestre-Perard C, Ponard D, Drouet C, Leroy V, Zarski JP, Dutertre N, Colomb MG (2002)**. Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. *Clin Exp Immunol* ;127:131-6.
- 152- **Kitazawa E, Igarashi T, Kawaguchi H, Kawashima Y, Hankins R, and Miyakawa H (2001)**. Differences in Anti-LKM-1 Autoantibody Immunoreactivity to CYP2D6 Antigenic Sites Between Hepatitis C Virus-negative and- positive Patients. *J. Autoimmun*; 17: 243-249.
- 153- **Ma Y, Thomas M, Okamoto M, Bogdanos D, Nagl S, Kerkar N, Lopes A, Muratori L, Lenzi M, Bianchi F, Mieli-Vergami G, and Vergani D (2002)**. Key Residues of a Major Cytochrome P4502D6 Epitope Are Located on the surface of the Molecule. *J. Immunol*; 169: 277-285.

Abréviations

AA : acide aminé

Ac : anticorps

ACAN: Anticorps Anti Nucléaires

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADP: Adenosine DiPhosphate

AI : Auto-Immune, Auto-Immunité

ARC : Association pour la Recherche contre le Cancer

ARN: Acide RiboNucléique

ATP: Adenosine TriPhosphate

BSA : SerumAlbumine Bovine

CD : cellules dendritiques

CHC: Carcinome Hépatocellulaire

C1Inh: Inhibiteur de C1

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CO₂ : dioxyde de carbone

CPA: Cellule Présentatrice de l'Antigène

CPK : Créatine PhosphoKinase

CRP : Protéine C Réactive

CYP450 2D6: cytochrome P450 2D6

DFP : Diisopropyl Fluoro Phosphate

DO : Densité Optique

DTT : DiThioThreitol

DRDC : Département de Réponse et Dynamique Cellulaire

EAE : Encéphalite Auto-immune Expérimentale

EBV: Virus de l'Epstein Barr

E coli : *Escherichia coli*

EDTA : acide Ethylène Diamino Tétra-Acétique

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EFS : Etablissement Français du Sang

FR: Facteur Rhumatoïde

HAI: Hépatite Auto-Immune

HLA: Human Leukocyte Antigen

HSc70: HSP70 constitutive

HSE: Heat Shock Element

HSF: Heat Shock Factor

HSP: Heat Shock Protein

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IDM: Infarctus Du Myocarde

IF : immunofluorescence

IFN: Interferon

IL2: InterLeukine 2

IPTG : IsoPropyl β -D-ThioGalactopyranoside

IRES : Internal Ribosome Entry Site

LB: Lymphocyte B

LEAD: Lupus Erythémateux Aigu Disséminé

LT: Lymphocyte T

LTc: Lymphocyte T cytotoxique

LTh1: Lymphocyte T helper de type 1
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, Time Of Flight
BCA : Acide Bicinchoninique
Mr : Mobilité relative
NO: Nitroxyde
OPD: ortho- Phénylène Diamine
PBS : Phosphate Buffered Salts
PCR : Polymerase Chain Reaction
PHRC : Projet Hospitalier de Recherche Clinique
PKR: Protéine Kinase R
PMSF : Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
RE: Réticulum Endoplasmique
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SVF : Serum de Veau Fœtal
TFA : Acide Trifluoro Acétique
TGO: transaminase ASAT
TGP: transaminase ALAT
TLCK : N- α -Tosyl-L-lysine-Chlorométhyl Kétone
TNF: Tumor Necrosis Factor
TPCK : N- α -Tosyl- L-Phénylalanyl-Chlorométhyl Kétone
VHB : Virus de l'Hépatite B
VHC: Virus de l'Hépatite C
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSV : Virus de la Stomatite Vésiculeuse
WB : Western Blot

Annexes

Annexe 1 : séquence de NS3

Séquence peptidique de la protéine NS3 du VHC (isolat G01, souche 1b).

Accessions Q9QP06 (Swissprot/TrEMBL), AJ238800 (NCBI)

HCV type 1b, isolat G01

Les chiffres en indice se rapportent à la séquence de la polyprotéine virale : 1007-1026 partie C-terminale de NS2 ; 1027-1207, partie protéase de NS3 ; 1208-1657, partie ARN hélicase de NS3. Les résidus His, Asp et Ser de la triade catalytique du site enzymatique de la protéase à sérine sont indiqués en caractères gras aux positions 1083, 1107, 1165. La séquence C-terminale RSHHHHHH a été ajoutée pour les besoins de la purification de la protéine recombinante.

Les séquences en caractères bleus correspondent aux séquences consensus pour la fixation des nucléotides par la partie hélicase.

MG₁₀₀₇REIHLGPADSLEGQGWRLLA₁₀₂₇HITAYSQQ
TRGLLGCIITSLTGRDRNQVEGEVQMVSTA 60

TQSFLATCVNGVCWTVYH₁₀₈₃**GAGSKTLGPKG**
PITQMYTNVDQD₁₁₀₇LVGWQAPPGARSLTPCTC 120

GSSDLVLRHADVIPVRRRGDSRGSLLSP
RPVSYLKGSS₁₁₆₅GGPLLCPSGHA VGIFRAAVC 180
TRGVAKAVDFVPVESMETTMRSPVFTDNSS
PPAVPQ**S**FQVAHLHAP**TGSGKS**TKVPAAYA 240

AQGYKVLVLNPSVAATLSFGAYMSKAHGID
PNIRTGVRTTTTGAPITYSTYGKFLADGGC 280

SGGAYDIIICDECHST**DSTTILGIGTVLDQ**

AETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEEV 360
ALSSTGE**I**PFYGKAIPETIKGGRHLIFCH
SKKKCDELA AKLSGLGLNAVAYYRGLDVSV 420

IPTSGDVIVVATDALMTGFTGDFDSVIDCN
TCVTQTVDFSLDPTFTIETTTVPQDAVSRS 480
QRRGRTGRGRIGIYRFVTPGERPSGMFDSS
VLCECYDAGCAWYELTPAETSVRLRAYLNT 540
PGLPVCQDHLEFWESVFTGLTHIDAHFLSQ
TKQAGDNFPYLVAYQATVCARAQAPPSWD 600
QMWKCLIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEV
TTTHPITKYIMACMSADLE**I**VT₁₆₅₇RSHHHHHH 660

Number of amino acids: 660

Molecular weight: 70607.3

Theoretical pI: 7.07

Annexe 2: séquence de C1Inh

Séquence peptidique de C1 inhibiteur humain

Gène ID *SERPING1*, *C1NH*

Accessions #X54486 (EMBL), [P05155](#) (NCBI), 1M6Q (modèle structural)

Modèle 3D ; Bos et al 2002 *Immunobiology* 205 : 518-533

Séquence ADNc ; Tosi et al 1986 *Gene* 198 42: 265-272

Le peptide signal constitue les résidus d'acide aminé 1-22. Le résidu P1 de la liaison peptidique coupée par les protéases cibles de C1Inh (Arg444, base No selon la protéine mature) est indiqué en caractère gras et souligné. Le résidu Val458 (caractère souligné) est l'objet d'un polymorphisme Val/Met.

Il est admis que la structure serpine s'organise à compter du résidu Cys123 (101 pour la protéine mature).

MASRLTLLTLLLLLAGDRASSNP NATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVI 50
SKMLFVEPILEVSSLPTTNSATTNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTI 100
QPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFCPGPVTLCSDLSEHSTEAVLGDALVDFS 150
LKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYP 200
KDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRV 250
LSNNSDANLELINTWVAKNTNNKISRLLDSLPSDTRLVLLNAIYLSAKWK 300
TTFDPKKTRMEPFHFKNSVIKVPMMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGGQLQLS 350
HNLSLVILVPQNLKHRLLEDMEQALSPSVFKAI MEKLEMSKFQPTLLTLPR 400
IKVTTSDMLSIM EKLEFFDFS YDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQT VLELT 450
ETGVEAAAASAISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPRA 500

L'angioedème héréditaire par déficit en C1 Inhibiteur est identifié sous le No OMIM* #106100.

* OMIM™ pour *Online Mendelian Inheritance in Man™*, une marque déposée de l'Université John Hopkins.

Number of amino acids: 500

Molecular weight (theoretical): 55,154.2

Theoretical pI: 6.09, 5.97 (mature)

49% carbohydrates (mass), 6 N-linked & 22 O-linked (putative sites), the majority in the N-terminal moiety (110 first residues)

2 disulfide bonds

Annexe 3: séquence du CYP 450 2D6

Cytochrome P450 2D6 P10635

Protein name Cytochrome P450 2D6 Synonyms EC [1.14.14.1](#) 497 résidus

CYP11D6 P450-DB1

Debrisoquine 4-hydroxylase

Gene name CYP2D6

MGLEALVPLA VIVAIFLLLVDLMHRRQRWA ARYPPGPLPL PGLGNLLHVD

FQNTPYCFDQ LRRRFGDVFS LQLAWTPVVV LNGLAAVREA LVTHGEDTAD
RPPVPITQIL GFGPRSQGVF LARYGPAWRE QRRFSVSTLR NLGLGKKSLE
QWVT**EEACL CA**AFANHSGR PFRPNGLLDK AVSNVIASLT CGRRFEYDDP
RFLRLDLAQ EGLKEESGFL REVLNAVPL LHIPALAGKV LRFQKAFLTQ
LDELLTEHRM TWDPAQPPRD LTEAFLAEME KAKGNPESSF **NDENLRIVVA**
DLFSAGMVTT STTLAWGLLL MILHPDVQRR VQQEIDDVIG QVRRPEMGDQ
AHMPYTTAVI HEVQRFGDIV PLGMTHMTRS DIEVQGFRIP KGTTLITNLS
SVLKDEAVWE KPFRFHPEHF LDAQGHFVKP EAFLPFSAGR RACLGEPLAR
MELFLFFTSL LQHFSFSVPT GQPRPSHHGV FAFLVSPSPY ELCAVPR

Annexe 4 : posters et articles concernant ce travail

Posters :

- Auto immunity associated with HCV infection: Detection and identification of polypeptide- stress protein complexes.

L.Bouillet, B.Chumpitazi, F.Csopaki, B.Dupret, E.Forest, J.Gagnon, JY Cesbron, C.Drouet.
10th DRDC-IBS workshop; Autrans february 2004

- Anti-lysate antibodies as a predictive factor for treatment outcome in hepatitis c patients

Chumpitazi Bernabé, Bouillet Laurence, Drouet Marie-Thérèse, Zarski Jean-Pierre, Drouet Christian

16è congrès européen d'immunologie. Paris; septembre 2006

-Anti-heat shock protein autoimmunity associated with chronic hepatitis c

Bouillet Laurence, Chumpitazi Bernabé, Miossec Pierre, Zarski Jean Pierre, Drouet Christian
16è congrès européen d'immunologie. Paris; septembre 2006

Articles :

- Articles soumis et en révision

Pour le J Clin Microbiol :

Autoantibodies to HSP70 and to a normalized lysate in hepatitis C patients: relationship with virological, biochemical and histological data

Chumpitazi Bernabé, Bouillet Laurence, Drouet Marie-Thérèse, Zarski Jean-Pierre, Drouet Christian

Pour le Clinical and Vaccine Immunology :

Antibody reactivity towards a lysate representative of a viral cell injury as a predictive factor for treatment outcome in hepatitis C virus

Chumpitazi Bernabé, Bouillet Laurence, Drouet Marie-Thérèse, Zarski Jean-Pierre, Drouet Christian

- Article qui doit être soumis :

Anti-Heat Shock Protein Autoimmunity associated with chronic Hepatitis C

Laurence Bouillet¹, Bernabé Chumpitazi², Pierre Miossec⁴, Jean-Pierre Zarski³, Christian Drouet¹