

Université de Montréal

**Études des modifications de la réponse apoptotique
induites par le virus de l'hépatite C dans des foies
normaux et infectés et dans la lignée cellulaire HuH7
contenant ou non un réplicon sous-génomique du virus**

Par

Aurélie André

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des Études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Microbiologie et Immunologie

Mars 2004

©, Aurélie André, 2004



W

4

U58

2004

V. 142

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Études des modifications de la réponse apoptotique induites par le virus de l'hépatite C dans des foies normaux et infectés et dans la lignée cellulaire HuH7 contenant ou non un réplicon sous-génomique du virus

présenté par :

Aurélie André

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Sophie Laberge, président-rapporteur

Dr Hugo Soudeyns, directeur de recherche

Dr Marc Bilodeau, co-directeur

Dr Fernando Alvarez, membre du jury

Résumé

Le virus de l'hépatite C représente un problème majeur de santé publique. En effet, le VHC infecte plus de 170 millions de personnes à travers le monde. Dans la plupart des cas, l'infection devient chronique et peut persister de nombreuses années, causant des lésions hépatiques inflammatoires pouvant évoluer en cirrhose et augmenter le risque de développer un carcinome hépatocellulaire. De plus en plus d'indices semblent indiquer que les lésions hépatiques sont causées surtout par les cellules immunitaires T. Les lymphocytes T éliminent les hépatocytes infectés par induction d'apoptose. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée finement régulé. La régulation de ce mécanisme est assurée par les protéines de la famille Bcl-2 qui comporte des membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. C'est l'équilibre entre les membres anti- et pro-apoptotiques qui détermine si le processus va s'accomplir. Jusqu'à présent de nombreuses études ont montré que les produits des gènes du VHC sont impliqués dans l'apoptose mais leurs résultats sont contradictoires.

Puisque dans la majorité des cas, le virus se maintient dans les hépatocytes, il doit avoir élaboré un moyen de résister aux mécanismes de défense de l'hôte dont l'apoptose. Le but de notre étude était donc de déterminer si les hépatocytes infectés sont plus résistants à l'apoptose que les non infectés.

Nos résultats n'ont montré aucune activation des caspases 3 et 8 dans les échantillons de foies normaux et infectés, ni même d'inhibition de l'activation de la caspase 3 lors de nos mesures de clivage du substrat relatif à chaque caspase par spectrofluorométrie. Ce qui suggère un faible niveau d'apoptose. Puis, nous avons voulu observer si les protéines de la famille Bcl-2 pouvaient être augmentées ou abaissées dans les échantillons de foies infectés. Les niveaux d'expression de protéines de la famille Bcl-2 pro- apoptotiques (Bax, Bid) et anti-apoptotiques (Bcl-x_L) ont été mesurés par western blot. Nous avons observé une hausse du niveau d'expression de la protéine Bax dans les foies infectés comparé au normaux. Pour Bcl-x_L et Bid, la différence de niveau d'expression de chaque protéine entre les deux types de foies n'a pas atteint de valeur significative, mais les résultats suggèrent une tendance à une plus forte expression de Bcl-x_L et une plus faible pour Bid dans les foies infectés. Ensuite, nous avons aussi utilisé

le modèle de réplicon sous-génomique du VHC dans une lignée de cellules hépatocytaires, HuH7. La plus forte expression de Bax a été retrouvée dans la lignée 9-13 contenant le réplicon sous-génomique du virus comparé à la lignée HuH7 ne contenant pas le réplicon. Pour Bcl-x_L, la tendance à être plus exprimé dans les foies infectés a été confirmée dans les lignées cellulaires. Le rapport Bax/Bcl-x_L n'est pas significativement différent entre les foies normaux et infectés ni entre la lignée HuH7 et 9-13, malgré la surexpression de Bax. Lorsque nous avons induit l'apoptose par déprivation en sérum, et avons mesuré la diminution de la viabilité cellulaire par réduction du MTT, la lignée 9-13 s'est montrée plus résistante que la HuH7. De même, lors d'induction de l'apoptose par ajout de thapsigargine, le décompte du pourcentage des cellules en apoptose, colorées au Hoescht 33258, a montré que la lignée contenant le réplicon est significativement plus résistante à l'apoptose que celle qui ne le contient pas. Ensuite, nous avons voulu inhiber la réplication virale et observer ses effets sur le niveau d'expression de Bcl-x_L. Nous avons traité les cellules à l'IFN- α et mesuré la réplication du réplicon par RT-PCR avec une amorce conçue pour amplifier le brin positif du VHC ainsi que le niveau d'expression de Bcl-x_L par western blot. Les résultats indiquent que l'interféron- α diminue la réplication du réplicon ainsi que l'expression de Bcl-x_L. Des expériences préliminaires ont montrés qu'en présence d'EGF, les MAP kinases ERK1/2 sont plus activées dans la lignée 9-13 que la HuH7. De plus, en présence d'un inhibiteur de l'activation des MAP kinases (PD98059), l'expression de Bcl-x_L est beaucoup diminuée, tandis que celle de Bax ne varie pas. Ceci suggère que la surexpression de Bcl-x_L dans la lignée 9-13 est médiée du moins en partie par une augmentation de l'activité des MAP kinases.

En conclusion, nos résultats indiquent que les hépatocytes infectés semblent être plus résistants à l'apoptose. Le virus et le réplicon modulent l'expression de protéines de la famille Bcl-2. Le réplicon sous génomique rend les hépatocytes plus résistants à l'apoptose. Cette résistance pourrait être médiée par une activation des ERK1/2 qui entraîne une surexpression de Bcl-x_L.

Mots-clés : Hépatite C, apoptose/ mort cellulaire, gènes de la famille Bcl-2, caspases, MAP kinases.

Abstract

Hepatitis C infection has become a major public health challenge. Indeed, HCV is currently infecting more than 170 million patients worldwide. In most cases, the infection is chronic in nature, and may persist for years, leading to inflammatory hepatic lesions that may later on be the cause of cirrhosis and increase the risk of hepatocellular carcinoma. It has become more commonly believed that immune T cells are the effectors of hepatic lesions during the chronic phase of the disease. T-lymphocytes eliminate infected hepatocytes through the induction of apoptosis. Apoptosis is a finely regulated programmed cell death process. The regulation of this process is assured by proteins in the Bcl-2 family inclusive of both pro and anti-apoptotic types. The balance of actions of these two types of proteins is what determines if and at which level apoptosis takes place. Until now, several studies have implicated HCV gene products in the apoptotic process but so far the results have been inconclusive. Since in most cases, the virus resides inside hepatocytes, we made the hypothesis that HCV infection of hepatocytes counteracts host immune defence mechanisms including apoptosis. Therefore, the goal of the present study was to determine if infected hepatocytes are more resistant to apoptosis than non infected cells.

Analysis of infected human liver tissue extracts from HCV-infected and non-infected patients show no evidence of caspases 3 and 8 activation. Also, no evidence of caspase 3 inhibitory activity was found. We also evaluated the levels of expression of proteins of the Bcl-2 family to assess for evidence of increased expression of anti-apoptotic or decreased expression of pro-apoptotic members in liver extracts from HCV-infected and non-infected human tissues. The expression of pro-apoptotic (Bax, Bid) and anti-apoptotic proteins (Bcl-x_L) were measured by Western Blotting. Results show a significant increase in the expression of Bax in infected livers in comparison to healthy livers whereas Bid levels slightly decreased in HCV-infected livers without reaching statistical significance. We also observed increased expression of Bcl-x_L in infected livers that merely reached statistical significance.

We also studied the expression of Bcl-2 proteins in cell lines containing the sub-genomic replicon of the virus in comparison with the HuH7 line that does not contain the replicon. Results show that the steady state protein levels of both Bcl-x_L and Bax were higher in the replicon cell line in comparison to the parental cell line. The Bcl-x_L/Bax ratio was also measured and found not to be different in between the cell lines.

Apoptosis was then induced in vitro through serum deprivation. Assessment of cell viability by reduction of MTT showed that the replicon cells were more resistant than the HuH7 parental cells. Moreover after induction of apoptosis with thapsigargin, the apoptotic index of cells stained with Hoescht 33258 demonstrated that the line containing the replicon was significantly more resistant to apoptosis than that which did not contain the replicon. In order to assess if the over-expression of Bcl-x_L was consequent to the presence of HCV genome and/or proteins, we inhibited viral replication with IFN- α and measured its effect on HCV RNA and Bcl-x_L expression. Our results show that interferon was a potent inhibitor of HCV replication and significantly decreased Bcl-x_L expression. Preliminary experiments were also performed to assess if activation of intracellular signaling cascade by HCV could be responsible for the increased expression of Bcl-x_L. First, we showed that, in the presence of EGF, MAP kinases ERK 1/2 are more strongly phosphorylated in the replicon line in comparison to the HuH7 line. Moreover, in the presence of an inhibitor for the activation of MAP kinases (PD98059), expression of Bcl-x_L was significantly decreased in contrast with that of Bax which remained unchanged. These results suggest that over-expression of Bcl-x_L in the replicon cell line might be mediated by increased activation of MAP kinases.

In conclusion, our results show that HCV-infected hepatocytes appear to be more resistant to apoptosis. The virus and the replicon modulate the expression of the Bcl-2 family proteins. The sub-genomic replicon makes hepatocytes more resistant to the apoptotic process. This resistance could be mediated by increased activation of ERK 1/2 leading to the increased expression of Bcl-x_L.

Keywords : Hepatitis C, apoptosis/cell death, Bcl-2 gene family, caspases, MAP kinases.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
1- Le virus de l'hépatite C.....	2
1.1- Historique.....	2
1.2- Clinique.....	2
1.2.1- Épidémiologie.....	2
1.2.2- Modes de transmission.....	3
1.2.3- Évolution naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C.....	3
1.2.4- Chronicité.....	4
1.2.5- Traitement.....	4
1.3- Biologie.....	5
1.3.1- Classification.....	5
1.3.2- Tropisme.....	5
1.3.3- Description du génome.....	5
1.3.4- Variabilité génotypique.....	7
1.3.4.1- Quasi-espèces.....	7
1.3.5- Cycle de réplication viral.....	8
1.3.6- Réaction immunitaire.....	11
1.3.6.1- Réaction immunitaire non-spécifique ou innée:.....	11
1.3.6.2- Réaction immunitaire adaptative humorale.....	11
1.3.6.3- Réponse immunitaire adaptative cellulaire.....	12
1.3.6.3.1- Réponse lymphocytaire T CD4+.....	12
1.3.6.3.2- Réponse lymphocytaire T CD8+ cytotoxique.....	13
1.4- Modèles expérimentaux.....	15
1.4.1- Modèles d'études du VHC.....	15
1.4.1.1- In vivo.....	15
1.4.1.1.1- Chimpanzé.....	15
1.4.1.1.2- Souris.....	15
1.4.1.2- In vitro.....	17
1.4.1.2.1- Cultures primaires.....	17
1.4.1.2.2- Cultures de lignées cellulaires.....	17
1.4.1.2.2.1- Modèle du réplicon.....	18
2- Apoptose.....	19
2.1- Définition.....	19
2.2- Explication des mécanismes.....	20
2.3- Signaux apoptotiques.....	21
2.4- Apoptose hépatique.....	22
2.4.1- Conditions physiologiques.....	22
2.4.2- Conditions pathologiques.....	22

2.4.3-	Mécanisme d'apoptose des hépatocytes infectés par les lymphocytes T cytotoxiques	23
2.5-	Description des protéines de l'apoptose	23
2.5.1-	Historique.....	23
2.5.2-	Les caspases.....	24
2.5.2.1-	Nomenclature.....	24
2.5.2.2-	Structure.....	24
2.5.2.3-	Activité.....	25
2.5.3-	Les protéines de la famille Bcl-2	26
2.5.3.1-	Historique.....	26
2.5.3.2-	Structure.....	27
2.5.3.3-	Activité.....	27
2.6-	Les deux voies de l'apoptose	28
2.6.1-	Voie extrinsèque / cellules de type I.....	29
2.6.2-	Voie intrinsèque/cellules de type II	30
3-	Virus et apoptose.....	31
3.1-	L'évasion virale en général.....	31
3.1.1-	Techniques passives de dissimulation	31
3.1.2-	Stratégies actives.....	32
3.2-	VHC et apoptose.....	34
4-	Hypothèses de travail.....	39
Matériel et Méthodes		40
1-	Matériel.....	41
1.1-	Foies humains	41
1.1.1-	Origine	41
1.1.2-	Préparation des homogénats protéiques à partir de foies humains	41
1.2-	Lignées cellulaires	42
1.2.1-	Description.....	42
1.2.2-	Conditions de culture des lignées cellulaires	42
2-	Méthodes.....	43
2.1-	Analyses enzymatiques.....	43
2.1.1-	Mesure de l'activité des caspases	43
2.1.2-	Mesure de l'activation de la caspase 3 dans des échantillons contenant de la caspase 3 recombinante	44
2.2-	Analyse morphométrique.....	44
2.2.1-	Mesure de l'apoptose nucléaire	44
2.3-	Analyse biochimique	45
2.3.1-	Réduction du MTT.....	45
2.4-	Mesure de l'expression des protéines Bcl-x _L , Bax, Bid, pERK1 et pERK2 et actine	46
2.4.1-	Préparation des échantillons protéiques à partir de cellules en culture	46
2.5-	RT-PCR : mesure du taux de transcription du brin positif du VHC et du 18S	47
2.6-	Analyses Statistiques	49
Résultats.....		50

1- Mesure de l'activité des caspases 3 et 8 dans des foies humains normaux et infectés par le virus de l'hépatite C.....	51
2- Niveau d'expression de protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-x _L , Bax, Bid) et ratio Bax/Bcl-x _L dans des échantillons de foies humains normaux et infectés par le VHC .	55
3- Niveau d'expression de protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-x _L , Bax) et ratio Bax/Bcl-x _L dans les lignées de cellules 9-13 et HuH7	60
4- Sensibilisation à la stimulation apoptotique dans les lignées HuH7 et 9-13	64
5- Effets de l'interféron- α sur la réplication du réplicon et sur le niveau d'expression de la protéine Bcl-x _L dans les lignées HuH7 et 9-13	68
6- MAPK	71
Discussion	74
Conclusion	84
Bibliographie.....	86

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différence entre l'apoptose et la nécrose.....	20
Tableau 2 : Liste d'agents stimulant ou inhibant l'apoptose	21
Tableau 3 : Caspases impliquées dans l'apoptose	26
Tableau 4 : Effet des différentes protéines du VHC sur le mécanisme de l'apoptose.....	35

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'évolution d'une infection par le VHC	3
Figure 2 : Structure du génome du VHC	5
Figure 3 : Structure de la polyprotéine du VHC	6
Figure 4 : Schéma du virus	8
Figure 5 : Schéma du cycle de réplication viral des Flaviviridae	10
Figure 6 : Schéma de la cascade des protéines apoptotiques.....	29
Figure 7 : Schéma du réplicon contenu dans la lignée 9-13	42
Figure 8 : Activité de la caspase 3 dans des foies normaux (N), infectés (VHC) et des hépatocytes de souris soumis à Fas (CTRL+).	52
Figure 9 : Activité de la caspase 8 dans des foies normaux (N), infectés (VHC) et des hépatocytes de souris soumis à Fas (CTRL+).	53
Figure 10 : Activité de la caspase 3 mesurée dans des foies normaux (N) auxquels a été ajouté 150 unités de caspase 3 recombinée (N+RC3) et infectés (VHC) auxquels a été ajouté 150 U de caspase 3 recombinée (HCV+ RC3) et des échantillons de 150 unités de caspase 3 recombinante activée (RC3) seule.	54
Figure 11 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x _L dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC).	56
Figure 12 : Niveau d'expression de la protéine Bax dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC).	57
Figure 13 : Niveau d'expression de la protéine Bid dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC).	58
Figure 14 : Ratio de Bax/Bcl-x _L dans des foies normaux (N) et infectés par le VHC (VHC).	59
Figure 15 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x _L dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C.	61
Figure 16 : Niveau d'expression de la protéine Bax dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C.	62
Figure 17 : Ratio de Bax/Bcl-x _L dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C.	63

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'évolution d'une infection par le VHC	3
Figure 2 : Structure du génome du VHC	5
Figure 3 : Structure de la polyprotéine du VHC	6
Figure 4 : Schéma du virus	8
Figure 5 : Schéma du cycle de réplication viral des Flaviviridae	10
Figure 6 : Schéma de la cascade des protéines apoptotiques.....	29
Figure 7 : Schéma du réplicon contenu dans la lignée 9-13	42
Figure 8 : Activité de la caspase 3 dans des foies normaux (N), infectés (VHC) et des hépatocytes de souris soumis à Fas (CTRL+).	52
Figure 9 : Activité de la caspase 8 dans des foies normaux (N), infectés (VHC) et des hépatocytes de souris soumis à Fas (CTRL+).	53
Figure 10 : Activité de la caspase 3 mesurée dans des foies normaux (N) auxquels a été ajouté 150 unités de caspase 3 recombinée (N+RC3) et infectés (VHC) auxquels a été ajouté 150 U de caspase 3 recombinée (HCV+ RC3) et des échantillons de 150 unités de caspase 3 recombinante activée (RC3) seule.	54
Figure 11 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x _L dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC).	56
Figure 12 : Niveau d'expression de la protéine Bax dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC).	57
Figure 13 : Niveau d'expression de la protéine Bid dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC).	58
Figure 14 : Ratio de Bax/Bcl-x _L dans des foies normaux (N) et infectés par le VHC (VHC).	59
Figure 15 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x _L dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C.	61
Figure 16 : Niveau d'expression de la protéine Bax dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C.	62
Figure 17 : Ratio de Bax/Bcl-x _L dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C.	63

Figure 18 : Cellules de cultures primaires d'hépatocytes de souris colorées avec le fluorochrome Hoescht 33258.....	64
Figure 19 : Index apoptotique des cellules des lignées HuH7 et 9-13 en présence de concentrations croissantes de thapsigargine	66
Figure 20 : Diminution de la viabilité suite à une déprivation en sérum foetal de veau dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C.....	67
Figure 21 : Niveau d'expression de l'ARN du brin positif du VHC dans la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C avec (+ INF) ou sans (- INF) interféron- α	69
Figure 22 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x _L dans la lignée la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C avec ou sans interféron- α	70
Figure 23 : Niveau d'expression des protéines phosphorylées ERK1 et ERK2 dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C avec ou sans EGF.	72
Figure 24 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x _L dans la lignée cellulaire 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C cultivée avec ou sans PD98059.	72
Figure 25 : Niveau d'expression de la protéine Bax dans la lignée cellulaire 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C cultivée avec ou sans PD98059.	73

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Facteur induisant l'apoptose (Apoptosis Inducing Factor)
ALAT	Transaminases (Alanine Aminotransferases)
Apaf-1	Facteur activant des protéases impliquées dans l'apoptose (Apoptosis Protease-activating factor-1)
APC	Cellule présentatrice d'antigène (Antigen Presenting Cell)
ARN	Acide ribonucléique
ASC	Protéine de l'apoptose sous forme d'agrégats (Apoptosis-associated speck-like protein)
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BH	Domaine homologue à la famille de protéines Bcl-2 (Bcl-2 Homology domain)
CAD	Déoxyribonucléase activée par les caspases (Caspase Activated Deoxyribonuclease)
CD	Groupe de différenciation des marqueurs de leucocytes (Cluster of Differentiation)
CED	Protéine de mort cellulaire de <i>C. elegans</i> (<i>C. elegans</i> Death Protein)
CIDE	Effecteur à effet-DFF induisant la mort cellulaire (Cell death-Inducing DFF-like Effector)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTRL	Contrôle
Cyt c	Cytochrome c
dATP	désoxy-Adénosine Tri-Phosphate
dCTP	désoxy- Cytosine- Tri-Phosphate
dNTP	désoxy-ribonucléotide
DD	Domaine de mort (Death Domain)
DED	Domaine effecteur de mort cellulaire (Death effector Domain)
DEVD-AMC	7-Amino-4-methylcoumarin,N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide
DFF	Facteur de fragmentation de l'ADN (DNA Fragmentation Factor)
DIABLO	Protéine avec un bas pI qui se lie directement aux IAP (Direct IAP binding protein with low pI),
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort cellulaire (Death Inducing Signaling Complex)
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DTT	2,3-dihydroxy-1,4-dithiobutane
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	Facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor)
EMCV	Virus de l'encéphalomyocardite (Encephalomyocarditis Virus)
ERK	Protéine kinase régulée par un signal extracellulaire (Extracellular signal Regulated Kinase)

FADD	Protéine possédant un domaine de mort cellulaire associé au Fas (Fas-Associated Protein with a Death Domain)
FasL	Ligand du récepteur Fas
FasR	Récepteur Fas
G-418	Généticine
HNANB	Hépatite non-A non-B
HVR1	Région hypervariable 1 (Hypervariable region1)
IAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose (Inhibitor of apoptosis)
ICAD	Inhibiteur de déoxyribonucléase activée par les caspases (Caspase Activated Deoxyribonuclease inhibitor)
ICE	Enzyme de conversion de l'Interleukine- 1- β (Interleukin-1 β -Converting enzyme)
IETD-AMC	7-Amino-4-méthylcoumarin, N-CBZ-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-threonyl-L-aspartic acid amide
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IRES	Site interne d'insertion dans le ribosome (Internal ribosome entry site)
ISG	Gène stimulé par l'interféron (Interferon stimulated-gene)
LPS	Lipo-poly-saccharide
MAP	Protéines activées par des agents mitogènes (Mitogen Activated Protein)
MTT	Bromure de diméthylthiazolyl-diphényltétrazolium
NF κ B	Facteur nucléaire κ B (Nuclear Factor κ B)
NK	Cellules cytotoxiques naturelles (Natural Killer)
NS	Protéine non-structurale
pb	paires de bases
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
PKR	Protéine kinase dépendante de l'ARN (RNA-dependent protein kinase)
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl (phenylmethylsulfonyl fluoride)
RE	Réticulum endoplasmique
RLDL	Récepteur des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoprotein Receptor)
RT-PCR	Transcription inverse suivie de réaction de polymérisation en chaîne (Reverse Transcription Polymerase Chain reaction)
SCID	Déficit immunitaire combiné sévère (Severe Combined Immunodeficiency Disease)
SDS	Dodécyl sulfate de sodium (Sodium Dodecyl Sulfate)
Smac	Deuxième activateur mitochondrial de la caspase (Second mitochondrial activator of caspases)
SVF	Sérum de veau fœtal
TCR	Récepteur des cellules T (T-Cell Receptor)

TGF	Facteur de croissance transformant (Transforming Growth Factor)
TNF	Facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)
TNFR	Récepteur du facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor Receptor)
TNFR 1	Récepteur de facteur de nécrose tumorale 1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1)
TRADD	Protéine possédant un domaine de mort cellulaire associé au récepteur TNF (Tumor Necrosis factor- Receptor associated death domain)
TRAF	Facteur activé par le récepteur de TNF (TNF receptor-activated factor)
TRAIL	Ligand induisant l'apoptose reliée au facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing Ligand)
UTR	Région non traduite (Untranslated region)
UV	Rayons ultra-violets
UVC	Rayons ultra-violets de type C
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Remerciements

Je voudrais remercier,

Le Dr Marc Bilodeau pour son accueil au sein du laboratoire, l'encadrement de mon projet, son écoute, son soutien financier, et pour m'avoir permis de participer au congrès AASLD.

Le Dr Hugo Soudeyns pour son précieux soutien et son encadrement.

Le Dr Fernando Alvarez pour son soutien financier.

Ceux qui m'ont encouragée, supportée et donnée de sacrés coups de main tout au long du parcours : Anne Gigout, François Bolduc, Jean-Philippe Therrien, Nicolas Jaffry, Paul Desjardins, Stéphanie Larose, Steve Hisiger, Thibaut Manière, Viorica Lascau, ma famille.

Introduction

1- Le virus de l'hépatite C

1.1- Historique

À l'époque de la seconde guerre mondiale, les hépatites étaient divisées en 2 groupes et nommées : hépatite infectieuse ou hépatite de sérum homologue⁽¹⁾. Plus tard, le terme d'hépatite A fut utilisé pour désigner l'hépatite infectieuse, celui d'hépatite B pour l'hépatite de sérum homologue. Il a ensuite été établi que les agents infectieux responsables de ces hépatites étaient des virus. Le diagnostic ne pouvait alors être basé que sur l'état clinique du patient et ses caractéristiques épidémiologiques. Puis, au début des années 70, des tests précis et sensibles de détection de l'hépatite B ont été développés et mis sur le marché^(2,3,4). En 1973, un test de détection de l'hépatite A fut développé⁽⁵⁾. Au moyen de ces tests de détection, plusieurs équipes étudièrent des patients présentant des cas divers d'hépatite. Leurs résultats mirent en évidence l'existence d'une nouvelle pathologie : l'hépatite non A non B^(6, 7,8) (HNANB).

En 1989, le génome du virus non A non B fut cloné et nommé virus de l'hépatite C { }. Le clone servit de base pour les premiers tests de détection du VHC. C'est ainsi qu'il est apparu que 80% des patients ayant une hépatite post- transfusionnelle et 58% des patients ayant une hépatite sans exposition au sang étaient infectés par le VHC^(9,10).

1.2- Clinique

1.2.1-Épidémiologie

Le virus de l'hépatite C affecte plus de 170 millions de personnes à travers le monde, soit environ 3% de la population totale. Sa prévalence varie beaucoup, étant très basse (0,1%) dans des pays comme l'Islande et la Norvège et très élevée dans des pays comme l'Égypte (18,1%)⁽¹¹⁾. Dans la population canadienne, la prévalence de ce virus est de 0,8%⁽¹²⁾.

1.2.2-Modes de transmission

Le VHC se transmet principalement par la voie parentérale. La transmission s'effectue surtout chez les usagers de drogues par voie intraveineuse ou nasale et, avant les années 90, chez les personnes transfusées⁽¹³⁾. Il existe une transmission nosocomiale due au matériel réutilisable et/ou mal décontaminé^(14,15). De même, les matériaux de tatouage, de perçage, d'acuponcture, ou encore de rasage sont susceptibles de transmettre le VHC par la voie parentérale⁽¹⁶⁾. La transmission par voie sexuelle est possible mais faible⁽¹⁷⁾. La transmission verticale mère-enfant est d'environ 5%, et indépendante du mode d'accouchement et de l'allaitement^(18,19).

1.2.3-Évolution naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C

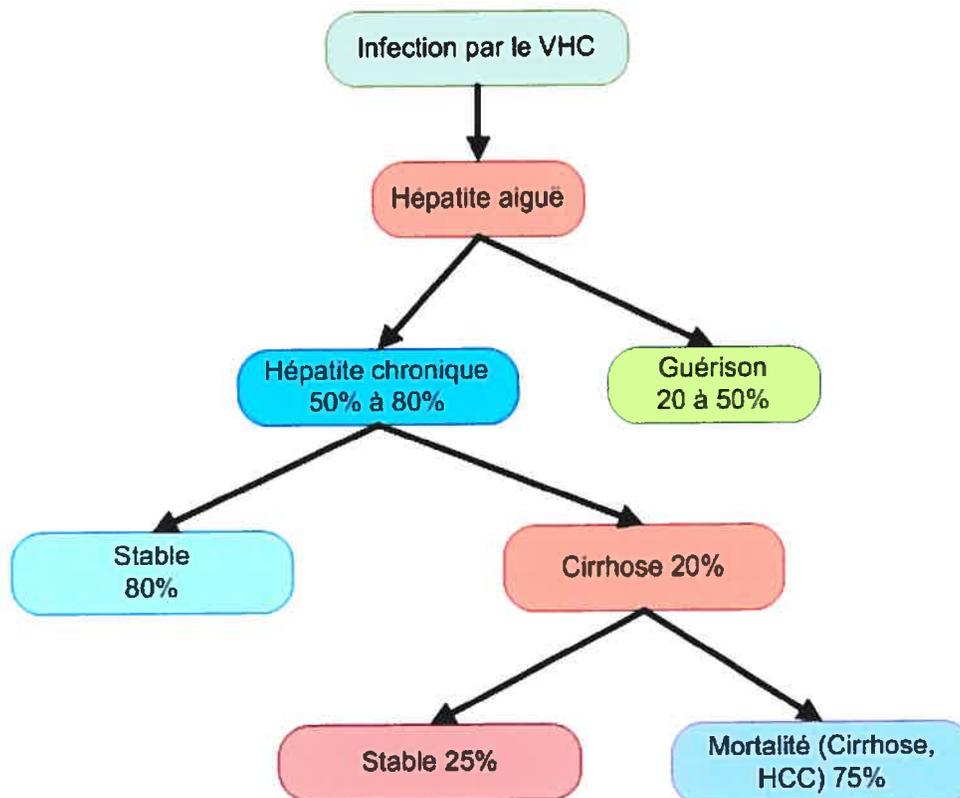


Figure 1 : Schéma de l'évolution d'une infection par le VHC
D'après Pawlotsky JM,⁽²⁰⁾

L'hépatite C représente un problème important de santé publique au niveau mondial. Elle est une cause majeure des cas d'hépatites chroniques, de cirrhose et d'hépatocarcinome. Comme seulement 20 à 30% de personnes infectées parviennent à éliminer le virus, le taux de chronicité est de 80 %, et 20 à 35% des personnes atteintes chroniquement développeront une cirrhose au cours de l'évolution de la maladie. Actuellement, c'est la cause principale de transplantation hépatique. En général, la maladie a un développement assez lent. L'infection passe souvent inaperçue au début, puis, en moyenne, les premiers symptômes cliniques apparaissent 10 ans après, la cirrhose se développe en 20 ans et l'hépatocarcinome en 30 ans. Il est estimé que 20 % des personnes non traitées et atteintes chroniquement vont développer une cirrhose et 1 à 5 % développeront un cancer du foie ou une insuffisance hépatique^(21,22,23).

1.2.4-Chronicité

La maladie est dite « chronique » lorsque l'inflammation perdure pendant plus de 6 mois consécutifs. Lors de la maladie chronique, le virus se réplique activement⁽²⁴⁾. Le virus aurait acquis un ou des mécanismes d'évasion face au système immunitaire de l'hôte.

1.2.5-Traitement

Le traitement de référence, à l'heure actuelle, est l'association de deux médicaments : l'Interféron alpha et la ribavirine⁽²⁵⁾.

Ce traitement est capable d'induire une réponse anti-virale soutenue chez environ 55% des patients chroniquement infectés^(26,27). Cependant, son coût est élevé et les effets secondaires peuvent être multiples et lourds^(28,29,30).

L'interféron fait partie d'un groupe de cytokines qui ont des propriétés immunomodulatrices et des effets antiviraux. La Ribavirine est un analogue de purine qui a des effets immunomodulateurs et est aussi un inhibiteur de l'enzyme inosine monophosphate déhydrogénase. L'interféron peut être pégylé c'est-à-dire lié de façon covalente par une molécule inerte de polyéthylène glycol hydrosoluble. Cette forme est plus stable dans le temps et permet un dosage plus simple pour le patient⁽³¹⁾.

1.3- Biologie

1.3.1-Classification

Le virus de l'hépatite C appartient à la famille des *Flaviviridae*, une famille qui comporte aussi d'autres pathogènes humains comme le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue et le virus du Nil occidental. Il est le seul membre du genre des hépacivirus⁽¹⁰⁾. Les particules virales de VHC mesurent environ 50 nm de diamètre⁽³²⁾.

1.3.2-Tropisme

Le VHC est capable d'infecter les hépatocytes et les cellules immunitaires, incluant la moelle osseuse et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)^(33,34). Cependant, le foie est le site principal de répllication pour ce virus puisqu'il en contient 10^8 à 10^{11} copies par gramme de tissu⁽³⁵⁾. Le virus n'est pas considéré comme cytopathique puisque l'ampleur de l'atteinte hépatique n'est pas liée à la charge virale⁽³⁶⁾. De même, lors d'une surexpression des protéines virales de structure, il n'y a pas de lésion hépatique chez des souris transgéniques⁽³⁷⁾. Par contre, le VHC de génotype 3 est associé à la stéatose (accumulation de lipides dans les hépatocytes)⁽³⁸⁾. Les sujets immunodéprimés sont une exception. En effet, leurs lésions sont en général plus sévères, le taux de répllication viral plus élevé et le pronostic moins bon⁽³⁹⁾. Mis à part cela, il n'y a pas de preuve que le virus soit responsable des lésions hépatiques durant l'infection chronique.

1.3.3-Description du génome



Figure 2 : Structure du génome du VHC
D'après Pawlotsky JM,⁽²⁰⁾

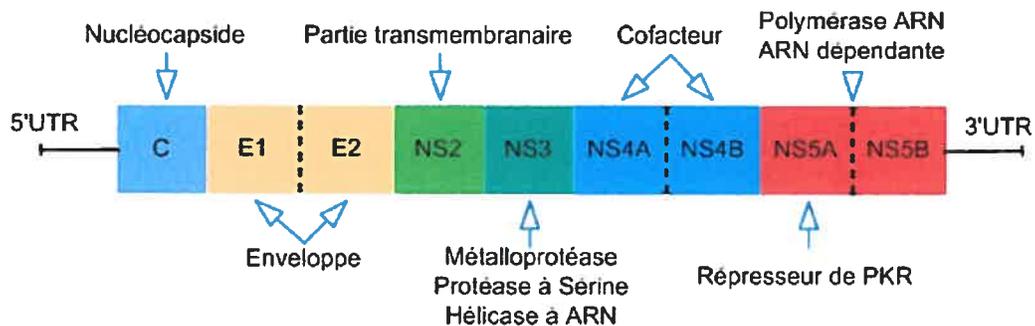


Figure 3 : Structure de la polyprotéine du VHC
D'après Pawlotsky JM,⁽²⁰⁾

Le génome du VHC est constitué d'une molécule d'ARN simple brin, de polarité positive, d'environ 9600 nucléotides de long. Il contient un cadre ouvert de lecture qui code pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés^(10,40). Aux extrémités 5' et 3' du génome, se trouvent des régions non codantes très conservées, appelées UTR (342 nucléotides en 5' et 270 en 3')⁽⁴¹⁾. Cette polyprotéine est clivée par des protéases cellulaires et virales afin de générer 10 protéines virales : core, E1 et E2 (protéines d'enveloppe), p7, NS2, NS3 (protéase et hélicase), NS4A (cofacteur de NS3), NS4B, NS5A et NS5B (la polymérase virale ARN dépendante).

Plus précisément, ce sont des protéases cellulaires qui clivent les protéines core (caspside) et les protéines d'enveloppes E1 et E2 ainsi que p7. Les protéines non structurales sont clivées par des enzymes virales. Les protéines NS2 et NS3 sont séparées par autoclivage de leur jonction^(42, 43). NS3 est clivée de NS4A par une activité sérine protéase virale associée à la partie amino-terminale de NS3⁽⁴⁴⁾. Cette sérine protéase clive par la même occasion NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

1.3.4-Variabilité génotypique

Le séquençage du génome du VHC a permis d'identifier 6 génotypes principaux (1 à 6) et de nombreux sous- types (a, b, c, ...)⁽⁴⁵⁾. En Amérique du nord et en Europe, c'est le génotype 1b qui est prépondérant. Or ce génotype est celui qui répond le moins aux traitements actuels⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾.

1.3.4.1- Quasi-espèces

Non seulement, il existe différents génotypes et sous-types de VHC, mais en plus, des séquences virales différentes ont été isolées à partir d'un même patient. Il faut savoir que les virus à ARN ont une réplication peu « fidèle » et très encline à faire des erreurs, étant donné que leur ARN polymérase n'a pas de fonction de correction 3'5' exonucléase. La conséquence de ceci est un fort taux de mutations compris entre mille à 1 milliard de fois plus important que pour les virus à ADN⁽⁴⁸⁾. Le taux de mutations du VHC est évalué à 10^3 à 10^4 substitutions de bases par génome par an^(49,50). Ceci équivaut environ à une mutation par molécule d'ARN à chaque synthèse de progéniture d'ARN viral par une cellule infectée⁽⁵¹⁾. Ceci a comme conséquence une hétérogénéité génomique du VHC au sein de chaque individu. Ces génomes portent l'appellation de quasi-espèces. Ils sont en compétition et une sélection du variant le plus adapté a sans cesse lieu.

Cette variabilité génétique des virus à ARN semblerait avoir d'importantes répercussions biologiques, en particulier, en ce qui concerne leur persistance chez l'hôte et leur résistance aux traitements et aux vaccins⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾.

Certaines zones du génome du VHC sont plus susceptibles de muter que d'autres. En particulier les séquences codant pour les protéines structurales E1 et E2 sont très sujettes aux variations. À l'intérieur de E2, il existe même une région hypervariable HVR1, constituée de 30 acides aminés, située dans la partie amino-terminale de E2.

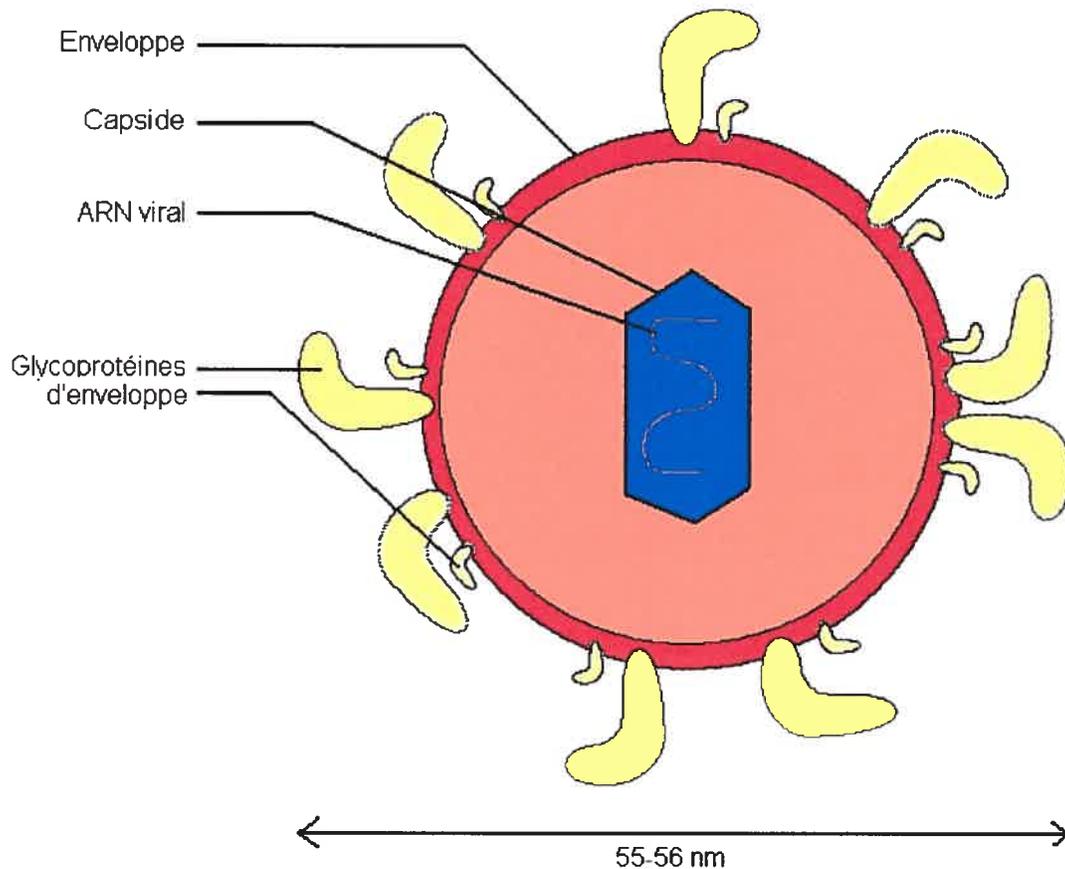


Figure 4 : Schéma du virus
D'après University of Eidelberg⁽⁵⁴⁾

Le virus de l'hépatite C possède une enveloppe (double couche lipidique issue de la membrane des cellules hôtes infectées) qui comporte les glycoprotéines virales E1 et E2. À l'intérieur de l'enveloppe se trouve la nucléocapside virale (Core), dans laquelle le génome viral (ARN) est logé.

1.3.5-Cycle de réplication viral

Le cycle de réplication du VHC n'est pas complètement connu, puisque aucun système de culture développé jusqu'à maintenant n'est assez adapté pour permettre l'étude virologique classique, biochimique, ou génétique du cycle de réplication complet du VHC⁽⁵⁵⁾.

Puisque le VHC est transmis principalement de façon parentérale, le virus utilise donc la circulation sanguine pour atteindre son site de réplication. Le virus se lie d'abord présumément à des récepteurs spécifiques. Actuellement, deux récepteurs potentiels ont été identifiés, il s'agit de CD81^(56,57) et du récepteur des lipoprotéines de faible densité (RLDL)^(58, 59).

L'interaction entre le récepteur et son anti-récepteur déclenche l'internalisation du virus par formation de puits de clathrine à la surface de la cellule. Le virus se retrouve dans des vésicules endocytaires. Il subit une acidification progressive qui provoque un changement de conformation aboutissant à une fusion entre la membrane virale et celle de la vésicule d'endocytose^(60,61)

Finalement, la capsid virale se retrouve relâchée dans le cytoplasme de la cellule hôte⁽⁶²⁾. C'est alors que survient la décapsidation du virus. Le brin positif est d'abord traduit puis répliqué en brins négatifs afin de servir de matrice pour resynthétiser des brins positifs qui seront traduits et/ou répliqués à leur tour. Les protéines deviennent matures dans le RE et sont assemblées. Les virions sont ensuite exportés vers la membrane de la cellule dans des vésicules via la voie sécrétoire. Ces vésicules fusionnent avec la membrane, et les virions sont relâchés dans le compartiment extra-cellulaire⁽²⁰⁾.

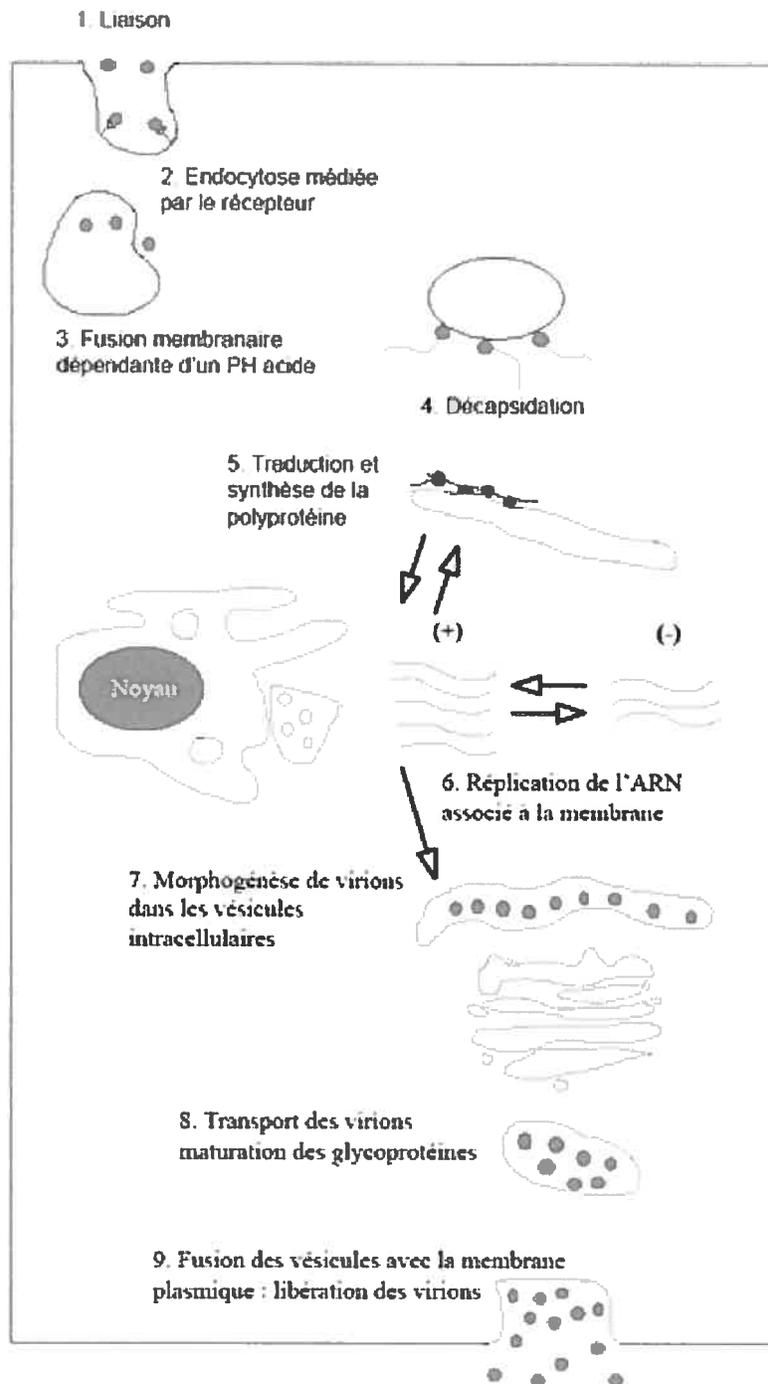


Figure 5 : Schéma du cycle de répliation viral des Flaviviridae
d'après Lindenbach BD et Rice CM⁽⁵⁵⁾

1.3.6-Réaction immunitaire

1.3.6.1- Réaction immunitaire non-spécifique ou innée:

Au tout début de l'infection, les premiers mécanismes de défense de l'hôte font intervenir la réponse immunitaire non spécifique. Elle implique les cellules NK (Natural Killer), les macrophages, les neutrophiles et la sécrétion précoce de cytokines. Cette étape est peu connue^(63,64).

1.3.6.2- Réaction immunitaire adaptative humorale

La réaction immunitaire humorale spécifique au VHC est détectable 1 à 34 semaines après l'infection⁽⁶⁵⁾. Elle est médiée par des lymphocytes B qui possèdent un site récepteur d'un antigène du VHC. Lorsque ces lymphocytes sont en présence du VHC, ils sont stimulés, se multiplient et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques à l'antigène qui les a activés.

Des tests immunoenzymatiques démontrent qu'il y a à la fois production d'anticorps dirigés contre les protéines structurales et non structurales du VHC⁽⁶⁶⁾. Plusieurs expériences semblent indiquer que certains anticorps auraient une action neutralisante. Chez le chimpanzé, l'injection d'anticorps spécifiques à la région HVR1 de la protéine E2 du VHC produits chez le lapin serait partiellement protectrice contre l'infection par le VHC^(67,68,69,70). Un autre exemple est retrouvé chez les humains infectés en phase aiguë ou chronique : les anticorps sont capables d'empêcher les protéines d'enveloppe du VHC de se fixer à des lignées cellulaires dont des lignées hépatocytaires⁽⁷¹⁾. Il existe de nombreux anticorps contre le VHC mais leur rôle exact quant à la protection contre l'infection est mal connu. Jusqu'à présent, il n'a pas été prouvé qu'une différence significative en qualité ou en quantité d'anticorps contre le VHC expliquerait la clairance ou la persistance du virus^(72,73,74).

En dépit d'un effet neutralisant, la réponse humorale anti-VHC n'est pas assez puissante pour empêcher une réinfection et la dissémination du virus puisque près de 80% des personnes développent une infection chronique.

1.3.6.3- Réponse immunitaire adaptative cellulaire

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est censée jouer un rôle important dans la défense contre les virus non cytopathiques comme le VHC puisqu'elle permet de reconnaître des antigènes viraux présents dans les cellules et de les éliminer.

1.3.6.3.1- Réponse lymphocytaire T CD4+

Trois à 4 semaines après l'infection, des lymphocytes T CD4+ sont détectables dans le sang périphérique. Leur présence dans des infiltrats cellulaires hépatiques coïncide avec l'augmentation d'ALAT sérique, ce qui signifie l'apparition clinique de l'hépatite.

Des études ont suggéré que la réponse lymphocytaire T CD4+ est déterminante pour l'issue de l'infection. En effet, les patients qui développent une réponse lymphocyte CD4+ T helper vigoureuse et multispécifique ont plus de chance d'éliminer le virus que ceux qui ont une réponse immunitaire faible, ou non maintenue^(75,76,77). L'intensité, la spécificité d'épitopes et les cytokines produites par les cellules T au tout début de l'infection peuvent prédire l'issue de l'infection. Cliniquement, les rémissions de l'infection par le VHC sont observées durant les trois premiers mois et surviennent plus souvent chez les patients qui présentent des signes évidents de maladie que chez ceux qui sont asymptomatiques^(78,79).

Certains épitopes sont plus fréquemment reconnus par les lymphocytes T CD4+, comme ceux contenus dans la séquence core (acides aminés 21 à 40), NS4 (1767 à 1786 et 1909 à 1929)⁽⁷⁶⁾ et NS3 (1251 à 1272)^(80,81). Il a déjà été suggéré que la séquence NS3 (1251 à 1259) serait associée à une infection plus contrôlée et à la clairance virale⁽⁸²⁾. Ces épitopes sont les plus immunogéniques et immunodominants mais aussi les plus

conservés parmi tous les génotypes de VHC, ce qui laisse entendre que ces séquences sont nécessaires pour le cycle de réplication du VHC.

D'autre part, des études indiquent qu'il semblerait que le VHC puisse persister malgré une prolifération de lymphocytes T CD4 + normale au cours de l'infection chronique^(83,84,85). D'un autre côté, d'autres études n'ont pas décelé de réponse T CD4+ chez tous les patients souffrant d'hépatite chronique. Le fait que les CD4+ ne soient pas toujours très actifs vis-à-vis des protéines virales pourrait influencer le devenir de l'infection et la mener soit à la chronicité soit à la clairance virale^(86,87).

De plus, la chronicité est associée au profil de sécrétion de cytokines engendré par la réponse immunitaire dépendante des épitopes viraux. En effet, la sécrétion de cytokines immunorégulatrices Th1 (IL-2 et IFN- γ) est plus fréquente chez les patients qui ne développent pas de maladie chronique, tandis que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires Th2 (IL-4, IL5, IL10) est plus courante chez patients dont la maladie devient chronique^(88,89). La clairance spontanée du virus se ferait selon le développement initial d'une forte réponse lymphocyte T CD4+ de type Th1 qui enclencherait une réponse T cytotoxique contre de multiples cibles virales^(77, 87,90,91).

Des études chez le chimpanzé ont suggéré qu'il est nécessaire que la réponse immunitaire soit dirigée contre au moins 5 à 6 sites de régions distinctes de la polyprotéine virale pour être efficace^(92, 93,94).

1.3.6.3.2- Réponse lymphocytaire T CD8+ cytotoxique

La réponse T cytotoxique se déroule dans les tissus lymphatiques et dans le foie des patients atteints d'hépatite C. La quantité de clones de lymphocytes T, dirigés contre le VHC, dans le sang périphérique et qui produisent de l'IFN- γ au cours de la l'infection aiguë est liée à la clairance du VHC dans les 6 mois après l'infection⁽⁹⁵⁾. Lors de la phase chronique de la maladie, les lymphocytes T cytotoxiques sont présents dans les infiltrats hépatiques et y sont plus nombreux que dans le sang périphérique^(96,97,98,99,100).

La clairance virale par les lymphocytes T cytotoxiques pourrait être due à la lyse des cellules infectées par apoptose et/ou à l'action des cytokines (IFN- γ ou TNF- α) qu'ils secrètent et qui peuvent stopper la réplication du virus.

Ces lymphocytes sont capables de contrôler la réplication virale puisque l'intensité de la réponse T cytotoxique est, en partie, inversement proportionnelle à la charge virale⁽¹⁰¹⁾. Comme pour les lymphocytes T CD4+, une plus grande diversité d'épitopes du VHC reconnus par les CD8+ est associée à une guérison spontanée⁽⁶⁷⁾. Certaines études ont montré que la réponse cellulaire cytotoxique spécifique est plus faible que celle espérée. Cette faiblesse ne serait pas due à une immunosuppression généralisée puisque la réponse lymphocytes T cytotoxiques chez ces patients est normale en présence des virus de l'influenza, d'Epstein-Barr et du cytomégalovirus^(97, 102).

Les études du VHC dans différents systèmes semblent indiquer que le virus est non-cytopathique pour la cellule. De plus, lorsqu'on induit une immunosuppression chez des patients atteints de façon chronique, on observe une normalisation des transaminases hépatiques ainsi qu'une augmentation de la virémie. Dès qu'on enlève cette immunosuppression, on observe une aggravation de l'hépatite⁽¹⁰³⁾. Il est admis à l'heure actuelle que le système immunitaire est donc, en grande partie, à l'origine des lésions induites dans la pathogenèse du VHC.

1.4- Modèles expérimentaux

1.4.1-Modèles d'études du VHC

Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe aucun système de culture pour le VHC qui reproduise totalement le cycle de réplication viral. Ceci explique la difficulté d'étudier ce virus, sa réplication, sa détection, les interactions hôte-virus, et de tester de nouveaux anti-viraux.

1.4.1.1- In vivo

1.4.1.1.1- Chimpanzé

Le chimpanzé (*Pan troglodytes*) est un hôte infecté par le VHC, mais la virémie de cette espèce est beaucoup moins persistante que chez l'humain (33% contre 80%)⁽¹⁰⁴⁾. Donc, la validité de ce modèle est limitée. De plus, les études avec ce genre d'animal sont très coûteuses, ce qui limite les analyses in vivo et l'étude de la pathogenèse dans ce modèle.

1.4.1.1.2- Souris

Des laboratoires ont développé des souris transgéniques qui expriment différentes protéines du VHC. Ces modèles ne permettent pas la réplication virale, mais permettent d'observer les effets physiologiques de la surexpression des protéines du virus indépendamment de l'action du système immunitaire⁽¹⁰⁵⁾. Cependant, les résultats de ce genre d'expérience sont souvent contradictoires⁽¹⁰⁶⁾.

D'autres modèles ont été mis au point afin de créer des souris permissives à l'infection par le VHC. Dans une première approche, des souris beige/nude/x-linked immunodéficientes (souris-BNX) ont été complètement irradiées, puis elles ont reçu une greffe de cellules de moëlle osseuse provenant de souris SCID (immunodéficientes).

Puis, ces souris ont subi une transplantation de fragments de foies de patients infectés par le VHC. Ces souris sont dites « triple chimères » ou « trimères ». L'ARN du VHC est détectable pendant 10 à 50 jours après la transplantation et, ceci, chez 50% à 85% de ces animaux^(107,108).

Ce modèle suggère que la transplantation d'hépatocytes humains et la réplication virale sont possibles dans cet animal trimère, mais la courte durée de survie du greffon ainsi que la faible concentration du VHC rendent difficile l'utilisation de ce modèle.

Un autre modèle de souris a été développé par la suite. Ces souris proviennent d'un croisement entre des souris Alb-uPa et des souris SCID. (Les souris Alb-uPa ont 4 gènes uPa (urokinase-type plasminogen activator) sous le contrôle du promoteur Alb (liver specific albumin). L'urokinase est sur-produite dans le foie de ces souris, ce qui conduit à la mort des hépatocytes^(109, 110). Les hépatocytes qui délètent le transgène uPa sont avantagés et se multiplient afin de repeupler le foie.

Mercer et al, ont croisé des souris Alb-uPa avec des SCID, jusqu'à obtenir des homozygotes Alb-uPa/ SCID, de façon à permettre la tolérance de cellules hépatiques humaines. Puis, ces souris ont subi une transplantation d'hépatocytes humains primaires qui ont repeuplé le foie jusqu'à 50% (en poids). Enfin, ces souris ont été infectées avec du sérum humain contaminé par le VHC. Les $\frac{3}{4}$ des souris présentent alors une virémie et des titres viraux proches de ce qui est observé chez l'humain⁽¹⁰⁹⁾. Cependant, ces souris sont fragiles et demandent des soins particuliers, rendant leur élevage plus complexe, et la greffe demande un équipement microchirurgical spécifique et une bonne technique chirurgicale⁽¹⁰⁵⁾.

Il existe aussi des modèles de virus substitués comme ceux du GBVB^(111,112,113) et du virus de la diarrhée bovine BVDV⁽¹¹⁴⁾. Ces modèles sont utilisés parce que la structure de ces virus est apparentée à celle du VHC.

1.4.1.2- In vitro

1.4.1.2.1- Cultures primaires

Puisque le VHC est hépatotrope, c'est tout naturellement que des essais d'infection de cultures primaires d'hépatocytes ont été tentées au moyen de sérum contaminé. Ces études ont eu recours à des hépatocytes fœtaux humains^(115, 116), des hépatocytes humains, des hépatocytes de chimpanzés⁽¹¹⁷⁾, ou des hépatocytes déjà infectés provenant de patients^(118,119, 120).

Étant donné que les cellules hématopoïétiques représentent un autre site de réplication naturel du virus^(121, 122), les chercheurs ont procédé à des infections de cellules mononuclées humaines du sang périphérique (PBMC)^(123, 124).

En outre, des expériences d'infection ont aussi eu lieu sur des cellules épithéliales humaines de vésicule biliaire puisque ces cellules ont été considérées comme les plus proches de l'épithélium hépatique⁽¹²⁵⁾.

Globalement, les systèmes de cultures primaires humaines sont intéressants pour la multiplication du VHC car l'ARN du virus y est détectable pendant 1 mois environ. Cependant, ces systèmes ne permettent pas la production significative de virus, leur utilisation est éphémère (maximum 1 mois) et difficile à organiser⁽¹²⁶⁾.

1.4.1.2.2- Cultures de lignées cellulaires

La majorité des essais d'infection ont porté sur des lignées cellulaires hépatocytaires et lymphocytaires humaines⁽¹²⁶⁾. Les résultats obtenus sont variables selon la lignée.

Aucun de ces systèmes de culture n'a permis une réelle production de nouveaux virions. Le virus est juste maintenu en culture, mais la production de protéines virales n'est pas significative. Seule la présence de brin ARN négatif (forme intermédiaire de la réplication du VHC) indique que la réplication virale a lieu. Cependant, les techniques de

détection de ce brin négatif sont peu spécifiques et peu sensibles : il faut donc être prudent avec ces résultats.

1.4.1.2.2.1- Modèle du réplicon

Le système du réplicon permet le soutien d'une réplication efficace du VHC en culture cellulaire. L'IRES (site d'entrée du ribosome) du VHC dirige l'expression du gène de la néomycine phosphotransférase (*neo*), tandis qu'un IRES hétérologue de EMCV (virus de l'encéphalomyocardite) promouvoit la traduction du polypeptide VHC^(127,128). Initialement, les réplicons ne comportaient que les gènes non structuraux de VHC, mais il existe maintenant des réplicons qui contiennent le génome en entier^(129,130). Le système de réplicon ne permet pas la production de nouveaux virions⁽⁵⁵⁾.

Dans le système du réplicon sous- génomique, les gènes de structures C, E1 et E2 ne sont pas présents et on retrouve le gène de la néomycine (*neo*). Ce gène confère, aux cellules permissives à la transcription du réplicon, la résistance au G418 et permet la sélection des cellules Huh7 qui expriment l'ARN du réplicon de façon continue.

L'expression des gènes non structuraux est augmentée par l'insertion d'un deuxième site interne d'entrée du ribosome dérivé de EMCV en aval du gène *neo*^(127,128). Le taux de transcription du réplicon est assez élevé, atteignant quelques milliers de copies d'ARN viraux par cellule^(128,131). Des mutations adaptatives qui permettent une meilleure efficacité de réplication ont été identifiées^(127,132). Le taux de réplication est bien supérieur à ce que l'on peut estimer chez les patients (50 particules virales par hépatocyte par jour)⁽¹³³⁾.

2- Apoptose

2.1- Définition

Apoptose est le nom donné au phénomène de mort cellulaire programmée par le génome. En d'autres termes, il s'agit d'une autodestruction ou d'un suicide contrôlé par la cellule. Elle est naturelle et nécessaire au bon développement et fonctionnement des organismes. Ce mécanisme a pour but de détruire des cellules devenues indésirables pour l'organisme et a lieu dans diverses situations dont : le développement (embryogenèse, morphogenèse) et l'homéostasie cellulaire (maintien de la quantité de cellules, équilibre entre multiplication (mitose) et élimination (apoptose cellulaire)) ainsi que dans la défense (lors d'infection par exemple) et dans la sénescence. Un dérèglement de ce mécanisme peut avoir des conséquences graves: un excès d'apoptose se rencontre dans les hépatites fulminantes, les maladies dégénératives et les maladies auto-immunes alors qu'un déficit en apoptose se retrouve dans les tumeurs. Ceci justifie donc une fine et complexe régulation à différents niveaux. L'apoptose a été découverte et ainsi dénommée et décrite en 1972 par Kerr et coll.⁽¹³⁴⁾.

L'apoptose est souvent comparée à la nécrose. Ces 2 événements sont en effet distincts. Leur seul point commun est leur implication dans la mort cellulaire. L'apoptose est active car sous contrôle génomique de la cellule tandis que la nécrose est passive ou plutôt subie. De nombreuses caractéristiques morphologiques et biochimiques illustrent le fossé qui sépare ces 2 mécanismes (tableau 1).

Tableau 1 : Différence entre l'apoptose et la nécrose

Apoptose	Nécrose
<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du volume cellulaire • Condensation de la chromatine en périphérie du noyau • Clivage de l'ADN en fragments de 180-200 pb (apparence en échelle en électrophorèse) • Bourgeonnement de la membrane plasmique (Blebs) • Modifications du cytosquelette=formation d'un réseau protéique insoluble • Fragmentation de la cellule en corps apoptotiques (organites intacts) • Pas de réaction inflammatoire • Événement physiologique et pathologique • Mécanisme régulé 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du volume cellulaire • Perte de l'intégrité de la membrane plasmique • Modifications et dégradations des organites (relargage du contenu lysosomal) • Réaction inflammatoire • Lyse de la cellule • Noyau intact très longtemps / cytoplasme désintégré • Dégradation de l'ADN tardive (spectre continu en électrophorèse) • Non régulée

Tableau d'après Dietrich JB,⁽¹³⁵⁾.

2.2- Explication des mécanismes

Brièvement, le phénomène apoptotique peut être scindé en 4 étapes. La première est celle du stimulus qui va enclencher une série d'événements qui mèneront éventuellement à l'apoptose. Le stimulus peut provenir de l'extérieur de la cellule (récepteurs à la surface de la cellule) ou bien être d'origine intracellulaire (conséquemment à une irradiation, des drogues, des toxines). La deuxième étape consiste en la reconnaissance et la transduction du signal vers les molécules effectrices. La

troisième étape est caractérisée par l'action de ces molécules effectrices. Enfin, l'ultime phase est celle pendant laquelle la cellule se détruit (condensation de la chromatine, dégradation de l'ADN, etc). Les cellules présentent alors un phénotype particulier, sont reconnues par les autres cellules de l'organisme et sont phagocytées par les macrophages⁽¹³⁶⁾.

2.3- Signaux apoptotiques

Il existe de nombreux stimuli apoptotiques. Le tableau 2 répertorie, de façon non exhaustive, une série d'agents stimulant ou inhibant ce mécanisme (tableau 2).

Tableau 2 : Liste d'agents stimulant ou inhibant l'apoptose

Inducteurs de l'apoptose	Inhibiteurs de l'apoptose
<u>Physiologiques :</u>	<u>Physiologiques :</u>
Protéines de la famille TNF	Facteurs de croissance
Déprivation en facteurs de croissance	Androgènes
TGF- β	Oestrogènes
Neurotransmetteurs	Acides aminés neutres
Glucocorticoïdes	Zinc
Calcium	Matrice extracellulaire
<u>Non physiologiques :</u>	<u>Non physiologiques :</u>
Choc thermique	Gènes viraux
Infections virales (VIH, VHB, VHC)	Gènes de la famille Bcl-2
Toxines (alcool)	Inhibiteurs de caspases
Oncogènes (myc, Rel, E1A)	Inhibiteurs de calpaïnes
Suppresseurs de tumeurs (p53)	Promoteurs tumoraux
Agents chimiothérapeutiques (tamoxifène)	
Rayons UV et gamma	

Tableau d'après Dietrich JB,⁽¹³⁵⁾.

2.4- Apoptose hépatique

L'apoptose joue un rôle autant dans le foie normal que dans diverses pathologies hépatiques et certaines situations expérimentales.

2.4.1-Conditions physiologiques

Comme pour tous les organes, l'apoptose est essentielle lors de l'organogenèse hépatique. Très peu d'apoptose est observée dans le foie normal. Chez les rongeurs, la moyenne est de 1 à 5 cellules apoptotiques pour 10 000 hépatocytes^(137, 138) et, ces cellules apoptotiques sont surtout situées dans la région des veinules hépatiques^(137,139). Certaines conditions provoquent une hyperplasie et une hypertrophie hépatiques car elles causent une augmentation de la demande fonctionnelle du foie. Une fois que le stimulus d'hyperplasie/hypertrophie est retiré, le foie reprend sa taille originale en supprimant par apoptose les cellules devenues superflues⁽¹³⁷⁾.

2.4.2-Conditions pathologiques

L'apoptose (la nécrose aussi) peut être causée par des drogues et des toxines. Parmi celles-ci sont incluses : l'éthanol^(139,140), les sels biliaires⁽¹⁴¹⁾, les drogues cytostatiques⁽¹⁴²⁾, le cuivre etc. De même, lors de rejet d'une allogreffe, la réaction de l'hôte contre le greffon est de l'apoptose médiée par le système immunitaire⁽¹⁴³⁾.

L'apoptose est aussi observée lors d'infections virales⁽¹⁴⁴⁾. Dans ce contexte, l'apoptose peut être vue comme un effet cytopathique direct et/ou comme résultat de la réponse immunitaire.

2.4.3-Mécanisme d'apoptose des hépatocytes infectés par les lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques activés reconnaissent les antigènes viraux complexés au CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) grâce à leur TCR (récepteur de cellule T). Le récepteur des cellules T est alors activé et déclenche l'expression et la sécrétion de ligands de mort (CD95L Fas, TRAIL). Ce ligand va se lier aux récepteurs de mort présents à la surface de la cellule infectée. Le récepteur de mort va alors changer de conformation et activer la pro-caspase 8. De plus, les lymphocytes T cytotoxiques relâchent des granules cytotoxiques qui contiennent des granzymes B et A et de la perforine. Le granzyme B internalisé est capable d'activer la procaspase 8 et d'autres caspases. Ces deux mécanismes convergent vers un mécanisme dépendant de la mitochondrie, qui va activer des caspases effectrices et aboutir à la mort de la cellule⁽¹⁴⁵⁾.

L'importance de l'apoptose dans la pathologie du VHC est appuyée par des caractéristiques pathomorphologiques comme le rétrécissement du volume cellulaire, la fragmentation du noyau, la présence de corps acidophiles (Councilman) et l'isolation des cellules des lobules hépatiques⁽¹⁴⁵⁾.

2.5- Description des protéines de l'apoptose

2.5.1-Historique

Les connaissances actuelles sur l'apoptose sont basées sur les travaux effectués sur le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ces travaux ont permis d'identifier des gènes ubiquitaires (CED-3, 4 et 9) impliqués dans ce mécanisme. Le clonage de ces gènes a révélé qu'il existait des gènes homologues chez les mammifères⁽¹⁴⁶⁾.

L'implication de la protéase à cystéine Ced-3 (*Caenorhabditis elegans* Death-3) dans l'apoptose fut mise en évidence pour la première fois en 1993. Son homologue humain est la caspase 1 ou ICE (interleukine 1 β converting enzyme)⁽¹⁴⁷⁾. L'homologue humain de la protéine Ced-4 est Apaf-1⁽¹⁴⁸⁾. Celui de Ced-9 est Bcl-2⁽¹⁴⁹⁾. Depuis, de

nombreuses études ont prouvé que le mécanisme apoptotique est conservé au cours de l'évolution des espèces.

2.5.2-Les caspases

2.5.2.1- Nomenclature

Ce sont des protéases riches en cystéine qui clivent une séquence d'acides aminés où on retrouve des résidus aspartates. Anciennement appelées protéases apoptogènes, elles ont été renommées caspases. La lettre C symbolise la cystéine du centre actif (QACXG) et le suffixe -aspase exprime la spécificité de clivage après un acide aspartique (C-*aspartate* protéase)⁽¹⁵⁰⁾. Jusqu'à maintenant, 14 caspases ont été identifiées et sont nommées caspase 1 à caspase 14. Sur les 14, au moins 8 jouent un rôle important dans l'apoptose^(151,152,153,154,155). Le granzyme B (enzyme secrétée par les lymphocytes T cytotoxiques) a la même spécificité de clivage que les caspases.

2.5.2.2- Structure

La structure des caspases est très conservée. Elle comprend 3 parties, un pro-domaine N-terminal de taille variable, un domaine de 17 à 21 kDa et un domaine de 10 à 14kDa. Certaines caspases possèdent, en plus, un domaine de liaison entre le grand et le petit domaine. La taille du prodomaine est très importante : c'est elle qui détermine le type de la caspase. Les caspases initiatrices ont pour fonction d'activer d'autres caspases et d'amplifier le signal apoptotique, tandis que les caspases effectrices sont activées par des caspases initiatrices et agissent sur les protéines qui sont critiques pour la survie cellulaire⁽¹⁵⁶⁾.

2.5.2.3- Activité

Les caspases produites sont originellement à l'état inactif (zymogène) dans le cytoplasme. Pour induire l'apoptose, elles doivent être activées par clivages successifs (au niveau d'un acide aspartique). Un premier clivage va séparer la petite sous-unité de la grande. Un autre clivage va libérer le prodomaine de la grande sous-unité. La caspase active est en fait un homodimère, composé de 2 petites sous-unités et de 2 grandes sous-unités^(157, 158). L'activation des caspases se fait en cascade. Les caspases initiatrices sont auto-activées tandis que les caspases effectrices sont activées par les initiatrices. Les caspases effectrices vont alors se charger de la protéolyse d'un large éventail de cibles impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire, conduisant à la mort cellulaire. Ces cibles sont des composants de la structure de la cellule (actine, lamine, etc.), des protéines régulatrices (protéine kinases ADN dépendantes, Bcl-2, etc.), inhibiteurs de déoxyribonucléases (DFF45, ICAD), des protéines proapoptotiques et des caspases afin d'amplifier le phénomène^(159,160,161). Les caspases sont les protéines effectrices de l'apoptose.

Tableau 3 : Caspases impliquées dans l'apoptose

Humain	Activée par	Rôle connu ou supposé
<u>Initiatrices :</u>		
Caspase 8	FADD	Voie de signalisation de récepteur de mort, prolifération cellulaire
Caspase 10	FADD	Voie de signalisation de récepteur de mort
Caspase 9	Apaf-1/cyt c	Activation des caspases 3 et 7 après un stress mitochondrial
Caspase 1	Ipaf,ASC, inflammasome	
Caspase 5 ^a		Maturation de IL-1 β /IL-18, apoptose
Caspase 4 ^a	Inflammasome	Maturation de IL-1 β /IL-18, stress LPS
Caspase 12 ^a		
Caspase 2	TRAF-2, calpaïne	Stress du RE
	DEFCAP, RAIDD	Stress pré-mitochondrial
<u>Effectrices :</u>		
Caspase 3	Caspase 9, 8, autres?	Clivage des substrats apoptotiques
Caspase 7	Caspase 9, 8, autres?	Clivage des substrats apoptotiques
Caspase 6	Caspase 3, 7	Clivage des lamines

Tableau d'après Adams JM⁽¹⁶²⁾

2.5.3-Les protéines de la famille Bcl-2

2.5.3.1- Historique

Bcl-2 est le nom d'un gène identifié, pour la première fois, dans des cellules de lymphomes folliculaires de type B (B- Cell Lymphoma/Leukemia). La translocation t(14-18) de ce gène est spécifique à ce lymphome⁽¹⁶³⁾. Depuis, beaucoup d'études ont montré que la surexpression de Bcl-2 inhibe l'apoptose induite par de nombreux stimuli^(164,165).

2.5.3.2- Structure

Les membres de la famille Bcl-2 sont caractérisés par la présence de domaines très conservés : BH1, BH2, BH3 et BH4 (Bcl-2 Homology domain). Ce sont ces domaines qui déterminent les interactions protéines/protéines ainsi que la régulation de l'apoptose. Les protéines anti-apoptotiques arborent au moins BH1, 2 et 3 (parfois BH4) ainsi qu'un domaine transmembranaire. Les protéines pro-apoptotiques contiennent au moins la région BH3⁽¹⁴⁹⁾.

On peut distinguer 3 sous-familles dans cette famille⁽¹⁶⁶⁾. Premièrement, il y a la sous-famille anti-apoptotique qui comprend Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et A1. Ces protéines partagent des homologies de séquences au niveau des certaines régions BH1, BH2, BH3 et BH4. Deuxièmement, il y a la sous-famille pro-apoptotique à multi-domaines qui comprend Bax, Bak, Mtd (Bok) et Bcl-rambo. Ces protéines possèdent des séquences homologues au niveau de BH1, BH2 et BH3. Troisièmement, la sous-famille pro-apoptotique « BH3 seul » est représentée par Bik (Nbk), Bad, Bid, Bim (Bod), Hrk (DP5), Noxa, Blk, Bnip3 (Nix), Bnip3L, Puma, p193, Bmf et Bcl-G. Ces protéines n'ont que BH3 comme région d'homologie de séquence.

Presque toutes les protéines de cette famille possèdent un domaine transmembranaire qui rend possible leur localisation au niveau de la membrane mitochondriale, de la membrane nucléaire externe ou encore du réticulum endoplasmique^(167,168).

2.5.3.3- Activité

Les protéines de la famille Bcl-2 ont pour rôle de contrôler l'apoptose. Cette régulation est réalisée par les interactions entre les membres de cette famille qui peuvent former des homodimères et/ou hétérodimères grâce à leurs domaines BH. Par exemple, Bcl-2 et Bcl-x_L peuvent former des homodimères anti-apoptotiques grâce à leurs domaines BH1 et BH2⁽¹⁶⁹⁾. De même, Bax peut former des homodimères pro-apoptotiques. Des hétérodimères formés par des protéines pro- et anti-apoptotiques

peuvent exister. Bax, Bak et Bad interagissent souvent avec Bcl-2 et Bcl-x_L grâce à leurs domaines BH^(170,171,172).

Il semblerait que l'apoptose soit régularisée selon la nature et la proportion de chaque type de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés^(173,174, 175). Un modèle basé sur le rapport entre Bcl-2/Bax a été proposé afin de déterminer la susceptibilité à l'apoptose d'une cellule. Si Bax est en excès par rapport à Bcl-2, l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 est inhibé et la cellule entre en apoptose⁽¹⁷⁰⁾.

Au niveau de la mitochondrie, les protéines de la famille Bcl-2 influent sur le trafic d'ATP ou de d-ATP, le potentiel de membrane mitochondrial et sur l'ouverture du canal par lequel sortent le cytochrome c et l'AIF (facteur induisant l'apoptose)⁽¹⁷⁶⁾. Le cytochrome c est impliqué directement dans l'activation de caspases tandis que Smac/DIABLO facilite l'activation des caspases en inhibant les protéines de la famille IAP (protéines inhibitrices de l'apoptose). Les membres anti-apoptotiques inhibent le relargage de facteurs apoptotiques tandis que les membres pro-apoptotiques le favorisent.

2.6- Les deux voies de l'apoptose

Il existe deux voies de signalisations de l'apoptose : la voie extrinsèque (indépendante des mitochondries) et la voie intrinsèque (dépendante des mitochondries). Les cellules sont divisées en 2 types selon la voie de signalisation apoptotique qu'elles utilisent : cellules de types I (voie extrinsèque), cellules de types II (voie intrinsèque). Les hépatocytes sont des cellules de type II.

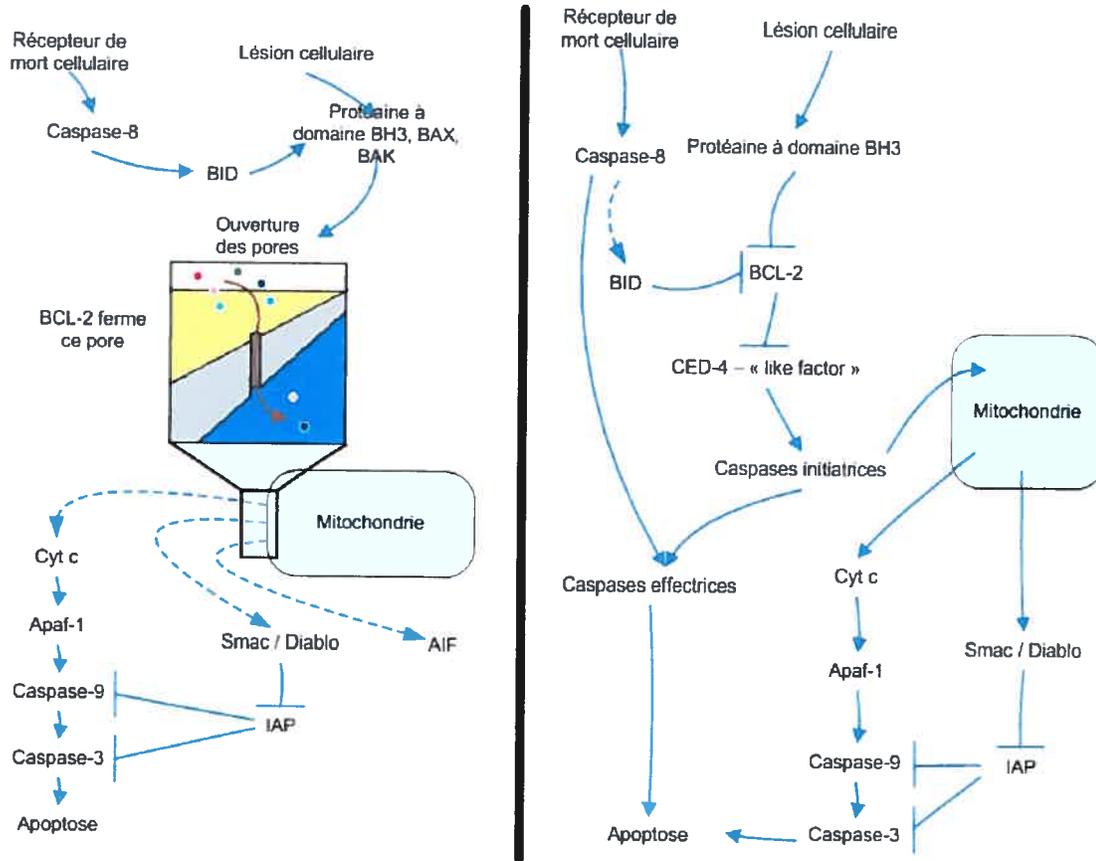


Figure 6 : Schéma de la cascade des protéines apoptotiques
d'après Finkel E,⁽¹⁷⁷⁾

2.6.1-Voie extrinsèque / cellules de type I

L'activation de cette voie se fait par la liaison d'un ligand à un récepteur transmembranaire de la surface cellulaire. Les récepteurs capables de transmettre les signaux apoptotiques appartiennent à la famille du TNF. Les plus connus sont Fas et TNFR1. Tous ces récepteurs possèdent un domaine intracellulaire DD (Death Domain) qui permet d'interagir avec d'autres protéines de cette voie de signalisation.

Suite à l'interaction entre un ligand et son récepteur de mort, par exemple FasL avec FasR, le récepteur s'oligomérisé⁽¹⁷⁸⁾. Le domaine DD du récepteur recrute alors des protéines adaptatrices qui possèdent aussi un domaine DD (exemple FADD qui contient

un DD et un DED, Death Effector Domain)^(179,180). Le DED se lie au prodomaine de la caspase 8 et le tout (pro-caspase 8 + protéine adaptatrice + récepteur de mort) forme un complexe appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex). La pro-caspase-8 est alors auto-clivée en caspase 8 active qui va à son tour activer d'autres caspases telles que la caspase 3. La cible de la caspase 3 est, entre autres, CAD (Caspase Activated Deoxyribonuclease), une endonucléase endogène qui entre dans le noyau et dégrade l'ADN, tuant ainsi la cellule⁽¹⁵⁹⁾.

2.6.2-Voie intrinsèque/cellules de type II

Une fois la caspase 8 activée, si sa quantité au niveau du DISC est faible, l'apoptose va emprunter la voie extrinsèque⁽¹⁸¹⁾. Alors la caspase 8 clive Bid (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2). La forme clivée de Bid est tBid. tBid est un des facteurs responsables du relargage du cytochrome c de la mitochondrie. Normalement le cytochrome c se trouve dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie⁽¹⁸²⁾. Sous l'action de tBid, la perméabilité membranaire de la mitochondrie augmente (les pores s'ouvrent, par dépolarisation) et son volume augmente, jusqu'à ce que la membrane se rompe laissant échapper, dans le cytoplasme, le cytochrome c et Smac/DIABLO (Second Mitochondria derived Activator of Caspases) et AIF (Apoptosis Inducing Factors). Bcl-2 peut empêcher l'ouverture des pores de perméabilité de la mitochondrie et ainsi inhiber le relargage du cytochrome c⁽¹⁸³⁾.

La relâche du cytochrome c entraîne la multimérisation de Apaf-1 (apoptosis protease activating factor) qui active les pro-caspases 9 et 3. Ces activations sont médiées par l'apoptosome (Apaf-1 + cytochrome c + caspase 9 + d-ATP). Smac/DIABLO inhibe les IAPs (Inhibitors of apoptotic proteins). AIF active des pro-caspases et agit sur le noyau pour induire la fragmentation de l'ADN^(183,184). Après que les caspases 8 et 9 sont activées, d'autres caspases, dont la caspase 3, sont alors clivées menant à la dégradation de l'ADN.

3- Virus et apoptose

3.1- L'évasion virale en général

Pour assurer sa survie et sa propagation, un virus doit être apte à persister le plus longtemps possible dans un hôte et/ou être capable d'infecter un grand nombre d'hôtes différents. Dans les deux cas, le virus doit posséder des mécanismes d'évasion du système immunitaire de l'organisme infecté. Au cours de leur évolution, les virus ont développé de nombreuses stratégies efficaces pour y parvenir. Ces mécanismes peuvent être classés en deux catégories : évasion passive ou évasion active. La première catégorie regroupe les techniques basées sur les divers moyens de se cacher du système immunitaire sans pour autant interagir avec celui-ci. La seconde catégorie rassemble les tactiques virales d'inhibition du système immunitaire⁽¹⁸⁵⁾.

3.1.1-Techniques passives de dissimulation

L'infection de sites privilégiés particuliers peut permettre au virus de se cacher du système immunitaire. Ces sites sont tout simplement moins accessibles aux cellules immunitaires (cellules du système nerveux central, chambre antérieure de l'œil) et offrent une certaine sécurité au virus^(185,186,187,188).

De même, la sous-expression de certaines protéines virales complexées avec le CMH I à la surface de la cellule hôte permet d'éviter leur détection⁽¹⁸⁹⁾.

Des mutations de séquence géniques virales permettent d'échapper aux anticorps et aux cellules T de l'hôte. Ces mutations sont spécifiques aux virus à ARN, puisqu'ils possèdent une ARN polymérase à fort taux de mutations (voir plus haut). Des phénomènes de réassortiments génétiques entre 2 virus peuvent générer de nouveaux virus^(190,191,192).

Le VHC utilise ce moyen d'évasion. Ceci lui permet de présenter une grande diversité d'épitopes qui ne seront pas neutralisés par les anticorps. Des épitopes variants

capables d'échapper à la neutralisation ont été isolés durant une infection au HCV⁽¹⁹³⁾. Chez les sujets dont la réponse humorale est altérée, la séquence HVR1 de E2 a un taux de mutation plus faible comparé aux sujets immunocompétents. Ceci suggère que les mutations de cette région sont dues à la pression de sélection et que HVR1 contient des épitopes dominants^(194, 195). De même, la variété de quasiespèces prédit l'évolution de l'infection. Si la variété est limitée, l'infection sera contrôlée et le virus éliminé. Par contre, si la variété est grande l'infection deviendra persistante⁽¹⁹⁶⁾.

De la même manière, les protéines du VHC présentent une grande variété d'épitopes CTL. Des mutants viraux capables d'échapper à la reconnaissance CTL ont été isolés chez le chimpanzé⁽¹⁹⁷⁾. De même, l'évolution de l'infection peut être déterminée par la sélection des variants viraux^(198,199). Des études ont montré que les épitopes CTL évoluent durant l'infection, ce qui suggère que les quasi-espèces du HCV sont soumises à une pression de sélection de la part du système immunitaire. La sélection précoce de mutants capables d'échapper au système immunitaire conduit à une infection chronique, tandis qu'un faible éventail d'épitopes CTL est associé à la cure de l'infection⁽¹⁹⁹⁾. Des études ont mis en évidence qu'une réponse CTL forte et durable ciblant de multiples épitopes a lieu dans les cas de guérison de l'infection^(79,200). Alors que dans les infections chroniques, la quantité de CTL spécifiques au HCV est plus faible dans le sang périphérique⁽²⁰¹⁾.

3.1.2-Stratégies actives

L'infection du thymus (organe de maturation des lymphocytes T), cause une sélection négative des cellules T qui reconnaissent le virus comme le soi. La conséquence de ceci est une tolérance partielle à ce virus puisqu'il n'y aura pas de lymphocytes T qui lui seront spécifiques, ni d'anticorps, sans pour autant créer une immunosuppression^(185,202).

Un autre moyen utilisé est la destruction des cellules présentatrices d'antigène (APC, cellules dendritiques, macrophages), ce qui entraîne une

immunosuppression générale^(203,204,205,206). L'inhibition de la présentation de l'antigène est possible en bloquant la présentation de l'antigène ce qui permet d'échapper à la surveillance immunitaire^(207,208,209).

En outre, l'expression de protéines capables de moduler la réponse immunitaire permettrait à certains virus de persister^(210,211,212).

L'infection des lymphocytes T et/ou B est un des moyens les plus efficaces de contrôler le système immunitaire^(213,214).

Le VHC est capable d'infecter les PBMC dont font partie les cellules B et T, ce qui entraîne diverses complications.

L'infection chronique est associée à long terme avec la cryoglobulinémie mixte de type II, la production d'auto-anticorps, l'apparition de facteurs rhumatoïdes ou le développement de lymphôme des cellules B non-Hodgkinien⁽⁶⁴⁾. La cryoglobulinémie mixte est causée par les complexes immuns de VHC et d'anticorps anti-VHC qui ont des propriétés de cryoprécipitation. La cryoglobulinémie est, elle-même, associée à l'expansion polyclonale ou monoclonale de cellules B, et peut évoluer en lymphome chez certains patients⁽²¹⁵⁾. La prévalence du HCV est très forte pour les patients qui ont un lymphome des cellules B non-Hodgkinien^(216,217).

CD81 forme un complexe avec plusieurs molécules sur les cellules T. La protéine E2 du VHC est capable lorsqu'elle se lie à CD81 d'abaisser le seuil d'activation des cellules T⁽²¹⁸⁾. Cette co-stimulation abaisse aussi le seuil d'activation de la production de l'IL-2 ce qui augmente la prolifération des cellules T, ainsi que celles de l'INF- γ et IL-4 et diminue la quantité de TCR⁽⁶⁴⁾.

Le VHC semblerait agir sur les cellules NK, par le biais de la protéine E2 et CD81 ce qui aurait pour conséquence l'inhibition leur action cytotoxique et de leur sécrétion d'interféron- γ ⁽²¹⁹⁾. Cette inhibition de la réponse immunitaire innée pourrait conférer un avantage temporel au VHC, lui permettant de se multiplier et générer des variants résistants à la réponse adaptative.

Le VHC pourrait aussi inhiber l'action des cellules dendritiques. Des études ont montrés que les cellules dendritiques dérivées de monocytes provenant de patients infectés chroniquement par le VHC sont incapables d'activer des cellules T allogéniques et de produire de l'interféron^(220,221). Les cellules dendritiques des patients infectés chroniquement ne répondent pas aux stimuli de maturation contrairement à celles des patients sains⁽²²²⁾. Chez les patients qui ont éliminé l'infection, la maturation des cellules dendritiques est complète⁽⁶⁴⁾.

De même, la production de protéines qui retardent ou inhibent l'apoptose (induite par les cellules T, ou autre) permet à des virus de prolonger leur vie et celle de leur cellule hôte^(223,224,225,226,227).

Dans le cas du VHC, des études ont montré que les protéines du VHC interagissent avec plusieurs voies de signalisations cellulaires. En particulier, les interactions de core avec des membres de la famille du récepteur TNF, peuvent avoir des effets inhibiteurs ou inducteurs sur l'apoptose selon le modèle utilisé (voir partie 3.2). De même, la protéine core est capable de moduler la voie de l'IFN. La protéine core est capable de se lier et d'activer PKR *in vitro*. PKR est induite par l'IFN et activé par la présence d'ARN double-brin. PKR se dimérise et s'autophosphoryle pour s'activer. Puis, PKR phosphoryle divers substrats dont eIF2- α et I κ B (abréviations), ce qui conduit à l'inhibition de la traduction, des effets anti-prolifératifs et finalement à l'apoptose⁽²²⁸⁾. E2 et NS5A interfèrent aussi dans la voie de l'IFN (voir plus bas).

3.2- VHC et apoptose

De nombreuses expériences ont été menées afin de déterminer si le virus de l'hépatite C induit ou inhibe l'apoptose. La grande majorité des recherches portent sur la protéine core. Les controverses portent surtout sur les effets de cette protéine au niveau des voies de signalisation de TNFR et de Fas. L'hétérogénéité des résultats peut s'expliquer par le fait que les études ont été réalisées de façon très diverses (sur une ou plusieurs protéines du virus, *in vitro* dans des lignées humaines ou animales, certains types cellulaires, sur des animaux *in vivo*, avec des vecteurs ou des conditions

expérimentales spécifiques ...). La divergence de résultats suggère que plusieurs facteurs doivent être considérés et que les conclusions devraient être faites uniquement en référence au modèle utilisé.

Bien que les résultats obtenus soient conflictuels, certains éléments (le fait que le virus ne soit pas cytopathique, que les lésions soient causées par le système immunitaire, que l'infection soit chronique et persiste pendant de nombreuses années chez la majorité des patients infectés, que l'infection soit associée au risque de HCC et finalement que beaucoup d'études concluent que certaines protéines ont des effets anti-apoptotiques) permettent de penser que le VHC inhiberait l'apoptose hépatocytaire.

Tableau 4 : Effet des différentes protéines du VHC sur le mécanisme de l'apoptose

VHC	Influence sur apoptose	Système utilisé	mécanisme	référence
Core	inhibition	In vitro HepG2	Surexpression de Bcl-x _L	²²⁹
Core	inhibition	In vitro lignée NIH 3T3	Inhibe activation de p38	²³⁰
Core	induction	In vitro lignée HuH7 Ex vivo tissus hépatocarcinomes humains	Activation de PKR	²²⁸
Core	Induction	In vivo souris transgéniques	Augmente l'apoptose due à Fas	²³¹
Core	Inhibition (apoptose induite par Fas)	In vivo souris transgéniques	Confère une résistance à Fas	²³²

VHC	Influence sur apoptose	Système utilisé	mécanisme	référence
Core	Inhibition (apoptose induite par cisplatine et c-myc)	In vitro lignée HeLa et CHO		²³³
Core	Inhibition (apoptose induite par TNF et Fas)	In vitro lignée HepG2	Inhibe activation de la caspase 8 et active NFkB	²³⁴
Core	Inhibition (apoptose induite par TNF- α)	In vitro lignée MCF7	Inhibe le clivage de PARP	²³⁵
Core	Induction (apoptose induite par Fas)	In vitro lignée Jurkat	Augmentation de l'activité caspase 3	²³⁶
Core	Induction (apoptose induite par privation de sérum)	In vitro CHO-K1	Surexpression de c-myc en absence de sérum Induction de p53, p21	²³⁷
Core + E1	Inhibition (apoptose induite par cytokines pro-inflammatoires)	In vivo souris transgéniques	Inhibition de chemokines	²³⁸

VHC	Influence sur apoptose	Système utilisé	mécanisme	référence
Core + E2	Pas d'inhibition lors de l'apoptose induite par TNFalpha et Fas	In vitro lignée HepG2		239
Core + NS5A	Induction	In vitro lignée COS-7	Active caspases	240
Core	Induction (apoptose induite par Fas)	In vitro lignée hepG2		241
Core	Induction (apoptose induite par TNF)	In vitro lignées BC10ME, HepG2, HeLa	Se lie à TNFR1	242
Core	inhibition	In vitro lignée NIH 3T3	Surexpression de Bcl-x _L et cycline D1	243
Core	Induction (apoptose induite par TNF)	In vitro lignée HEK 293	Core facilite le recrutement de FADD par TNFR1	244

VHC	Influence sur apoptose	Système utilisé	mécanisme	référence
NS2 VHC	Inhibition apoptose induite par CIDE B inhibition apoptose induite par CIDE B	In vitro lignées HeLa, Cos 7m Hep G2 In vivo : souris adénoinfectée par génome complet de VHC	Liaison avec CIDE B qui l'inhibe	²⁴⁵
NS3	Inhibition apoptose induite par Actinomycine D	In vitro lignée NIH 3T3	Inhibition de p53, mais pas de p21	²⁴⁶
NS5 A	Inhibition apoptose induite par TNF	In vivo souris transgéniques	NS5A inhibe association entre TRADD et FADD et bloque activation de NFκB par TRADD	²⁴⁷
NS5 A	Inhibition apoptose induite présence d'ARN double brin	In vitro lignée HeLa 1B and HeLa 1B-5	NS5A se lie à PKR et l'inhibe	²⁴⁸
NS5 A	Inhibition	in vitro Hep3B	Interaction avec p53	²⁴⁹
Core + E1 + E2/p7	Aucun effet	In vivo souris transgéniques		²⁵⁰

VHC	Influence sur apoptose	Système utilisé	mécanisme	référence
VHC	Induction (apoptose induite par Fas)	Ex vivo PBMC	Augmentation de l'expression de Fas	²⁵¹

4- Hypothèses de travail

Le fait que l'infection par le VHC puisse devenir chronique repose sur l'inefficacité du système immunitaire à enrayer complètement la propagation virale et sur l'aptitude du virus à déjouer ce même système immunitaire.

Les cellules infectées sont normalement détruites par l'action des lymphocytes T cytotoxiques, qui libèrent le granzyme B et les granules de perforine ou activent les récepteurs de mort cellulaire, aboutissant au déclenchement de l'apoptose et à la mort de la cellule et par la même occasion du virus qu'elle contient. Or, à partir du moment où l'infection devient chronique, il est concevable de penser que certaines cellules infectées échappent à cette destruction spécifique. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules infectées de façon persistante sont plus résistantes à l'apoptose que celles qui ne sont pas infectées. Cette résistance serait conférée par le virus lui-même. Plus précisément, le but de l'étude est de montrer que cette résistance serait modulée (en partie, du moins) par une surexpression de protéines anti-apoptotiques et/ou une sous-expression de protéines pro-apoptotiques.

Matériel et Méthodes

1- Matériel

1.1- Foies humains

1.1.1-Origine

Les expériences ont nécessité des spécimens de foies humains provenant de patients infectés par le virus de l'hépatite C et de patients non infectés. Pour les échantillons normaux, les spécimens proviennent d'hépatectomies partielles pour tumeur du foie. Les morceaux utilisés sont prélevés à distance de la tumeur. En ce qui concerne les foies infectés, ils sont originaires de résections hépatiques pour transplantation. Tous ces échantillons ont été congelés immédiatement après leur prélèvement et leur transfert dans l'azote liquide, à -80°C . Ces échantillons ont été obtenus après consentement éclairé des personnes à l'origine de ces spécimens.

1.1.2-Préparation des homogénats protéiques à partir de foies humains

Des homogénats protéiques ont été préparés à partir des foies congelés à -80°C . Les morceaux de foies ont été fractionnés. Puis, ils ont été pesés, et homogénéisés sur glace, dans le tampon RIPA/20% d'inhibiteurs de protéases (10 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptine, 10 $\mu\text{g/ml}$ d'aprotinine, 10 $\mu\text{g/ml}$ d'inhibiteur de la trypsine du soja et 100 μM de benzamidine), à la concentration de 300 $\mu\text{l}/100\text{ mg}$ de tissus, et finalement soniqués.

1.2- Lignées cellulaires

1.2.1-Description

Les hépatocytes de la lignée parentale HuH7 et de la lignée contenant le réplicon (9-13) ont été fournies respectivement par le D^r Soudeyns de l'hôpital Sainte-Justine (Montréal) et D^r Bartenschlager de l'Institut de Virologie de l'Université Johannes-Gutenberg de Mainz (Allemagne). L'unique différence entre les deux lignées est la présence d'un réplicon sous-génomique du VHC dans la lignée 9-13.



Figure 7 : Schéma du réplicon contenu dans la lignée 9-13 : le réplicon contient les séquences codant pour les protéines virales NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B du VHC.

1.2.2-Conditions de culture des lignées cellulaires

Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM (Gibco, Burlington, ON) contenant 2mM de L-Alanyl-L-Glutamine (Glutamax®, Gibco), 100 UI de Pénicilline/Streptomycine® (Gibco) ainsi que 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco). La sélection des cellules 9-13 est effectuée par ajout de 0,5 mg/ml de G-418 (Généticine®, Gibco) dans le milieu. Cette sélection est rendue possible puisqu'un gène de résistance à la néomycine a été inséré dans la région non codante 5' du réplicon. Les cellules sont ensemencées dans le DMEM à 10% de SVF et pour les 9-13 uniquement, du G-418 est présent dans le milieu. Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

Pendant les expériences, le G-418 n'a pas été utilisé dans la préparation du milieu. Les cellules ont été ensemencées à la concentration de 26 000 cellules /cm² dans les pétris de 35mm de diamètre, et 26 400 cellules par cm² dans les plaques de 96 puits. Le milieu utilisé pour les expériences d'induction de l'apoptose par déprivation de sérum est le

DMEM seul. Pour l'induction de l'apoptose par ajout de thapsigargine (Sigma-Aldrich), le milieu DMEM était additionné de 10% de SVF et contenait différentes concentrations de thapsigargine (de 0 à 10 μM).

Le milieu utilisé pour l'induction de l'activation des MAP kinases, est le DMEM plus 10% de SVF, contenant 50 ng/ml de EGF Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'inhibition des MAP kinases a été induite par l'ajout de 25 μM de PD98059 Calbiochem (San Diego, CA) pendant 48 heures.

2- Méthodes

2.1- Analyses enzymatiques

2.1.1-Mesure de l'activité des caspases

Les échantillons utilisés ont été préparés selon la même méthode que pour le western blot (voir plus bas) sauf pour le tampon de lyse (10mM HEPES(pH 7,4), 5mM MgCl_2 , 42mM KCl, 0,1 M EDTA, 0,1% 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammoniol)-2-hydroxy-1-propane-sulfonate (CHAPSO), 0,1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptine, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinine, 10 $\mu\text{g/ml}$ d'inhibiteur de la trypsine de soja, 100mM de benzamidine) pendant 15 minutes sur la glace et puis centrifugées à 13 000 g pendant 10 minutes.

L'activité protéolytique de la caspase 3 et 8 a été mesurée par le clivage des substrats fluorescents de la caspase 3 (Ac-DEVD-AMC, Medicorp, Montréal, QC) et caspase 8 (Ac-IETD-AMC, Medicorp, Montréal, QC) (100 μM) dans un mélange de réaction contenant 100 μg de protéines pour la caspase 3 et 200 μg pour la caspase 8 dans un tampon d'essai de 100mM HEPES (pH 7,4), 200mM NaCl, 2 mM EDTA, 20% sucrose, 0,2% CHAPSO, et 20 mM DTT pendant 30 minutes à 37°C à l'obscurité.

La fluorescence a été mesurée dans un spectrofluoromètre à microplaque SPECTRAMax GEMINI (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) en utilisant les longueurs d'ondes d'excitation respectives de 380 et 460 nm pour la caspase 3 et la 8. Le taux maximal de clivage de substrat ($V_{max/s}$) a été calculé à l'aide du logiciel SOFTmax pro (Molecular Devices, Sunnyvale, Ca), et l'activité des caspases a été obtenue à partir de la courbe de calibration de $V_{max/s}$ selon les unités de caspase 3 ou 8 recombinante humaine (Calbiochem, San Diego, CA).

2.1.2-Mesure de l'activation de la caspase 3 dans des échantillons contenant de la caspase 3 recombinante

L'activité de la caspase 3 a été mesurée, en duplicata, selon le protocole décrit précédemment dans des échantillons sains ainsi que des échantillons infectés. De plus, à ces mêmes échantillons a été ajoutée la caspase 3 recombinante à la dose de 100 UI (Calbiochem, San Diego, CA) afin d'évaluer la présence d'une activité inhibitrice de la caspase 3. Puis, l'activité caspase 3 a été mesurée comme décrit précédemment.

2.2- Analyse morphométrique

2.2.1-Mesure de l'apoptose nucléaire

Les cellules Huh7 et 9-13 ont été incubées dans le milieu DMEM additionné de 10% de SVF dans des pétris de 20mm de diamètre. Après 24h d'attachement, les milieux ont été remplacés par du milieu frais contenant de 0 à 10 μ M de thapsigargine (Sigma-Aldrich). À la fin de la période de culture, le milieu a été aspiré et les cellules fixées avec une solution de 5% de Formaldéhyde à température de la pièce durant 20 minutes.

Les cellules ont été colorées au Hoescht 33528 (0,25 μ g/ml) pendant 15 minutes, et lavées à l'eau distillée. Les pétris ont ensuite été rangés afin de sécher dans l'obscurité.

Une fois les pétris secs, la coloration des noyaux a été observée à l'aide d'un microscope à fluorescence ultraviolette (BX50F, Olympus Optical Co, Japan). Le filtre d'excitation est de 355 nm et celui d'émission de 465 nm. Les noyaux sont considérés en apoptose si de la chromatine condensée est présente sur le pourtour du noyau ou s'il y a des corps apoptotiques⁽²⁵²⁾. Pour chaque pétri, 400 noyaux ont été comptés, et la proportion de noyaux apoptotiques a été exprimée en pourcentage par rapport au nombre total de noyaux fluorescents.

2.3- Analyse biochimique

2.3.1-Réduction du MTT

La mesure de la quantité de MTT réduit sert à évaluer le taux de viabilité cellulaire. Le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, Oakville, ON) est réduit en cristaux de formazan par la mitochondrie.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits, à la concentration de 7400 cellules par puit (26 400 cellules par cm²). Après 24 heures d'attachement, le milieu a été remplacé par du milieu frais ne contenant pas de sérum pour induire l'apoptose. Au bout de 48h de culture sans sérum, le milieu a été aspiré et remplacé par du DMEM contenant 2 mg/ml de MTT.

Ensuite, les cultures ont été mises à incuber à 37°C sous 5% CO₂, pendant 3 heures. Le milieu a été aspiré de nouveau et les cellules remises à incuber avec une solution de DMSO pendant 30 minutes à 37°C sous 5% CO₂. Les cristaux de Formazan solubilisés par le DMSO (Diméthyl Sulfoxyde, Sigma)⁽²⁵³⁾ sont quantifiés par densité optique à 490 nm.

La viabilité est évaluée par le rapport d'absorbance des différentes conditions avec les cultures contrôles.

2.4- Mesure de l'expression des protéines Bcl-x_L, Bax, Bid, pERK1 et pERK2 et actine

2.4.1-Préparation des échantillons protéiques à partir de cellules en culture

Les lysats cellulaires ont été récoltés dans un tampon phosphate salin (pH 7,4) contenant 1% d'Igepal CA-630, 0,5% de déoxycholate, 0,1% de sodium dodécyl sulphate, 10 µg/ml de leupeptine, 10 µg/ml d'aprotinine, 10µg/ml d'inhibiteur de la trypsine du soja et 100 µM de benzamidine.

Une quantité égale de protéines (100µg), mesurée par la technique de Bradford⁽²⁵⁴⁾, a été séparée par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide à 15% et transférée sur membranes de Polyvinylidene Fluoride (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech, Mississauga, ON). Les membranes ont ensuite été incubées en présence d'un anticorps primaire puis d'un anticorps secondaire.

Pour Bcl-x_L, l'anticorps primaire est un polyclonal de lapin dirigé contre la protéine Bcl-x_L humaine (BD Transduction Laboratories, Pharmingen Canada, Mississauga, ON), utilisé à la dilution 1/250. L'anticorps secondaire que nous avons utilisé est l'anticorps anti-immunoglobulines de lapin lié à la peroxydase (Pharmingen /BD Transduction Laboratoires Mississauga, ON) à la dilution 1/20 000.

L'anticorps primaire utilisé pour la protéine Bax est un anticorps de lapin dirigé contre la protéine Bax (Santa Cruz Biotechnology, Inc) à la dilution 1/100. Puis comme anticorps secondaire nous avons utilisé l'anticorps anti Immunoglobulines de lapin lié à la peroxydase (Pharmingen /BD Transduction Laboratoires) à la dose 1/10 000.

Pour la protéine Bid, l'anticorps primaire que nous avons utilisé est un anticorps de lapin polyclonal, (R&D Systems) à la dilution 1/500. Comme anticorps secondaire, un anticorps de chèvre dirigé contre les Immunoglobulines de lapin et couplé à la peroxydase (BD Pharmingen) fut utilisé à la concentration 1/2000.

Pour pERK1 et pERK2, l'anticorps primaire fut un anticorps monoclonal de souris dirigé contre pERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) utilisé à la concentration 1/1000. Puis en anticorps secondaire, nous avons utilisé un anticorps de souris couplé à la peroxydase (Pharmingen /BD Transduction Laboratories) à la dilution 1/10 000.

Pour évaluer la quantité de protéines déposées, les membranes ont aussi été incubées avec l'anticorps monoclonal de souris anti-actine (1/5000 Oncogene Research, Cambridge, MA Products) suivi d'un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à une peroxydase(1/20 000 Pharmingen /BD Transduction Laboratoires). Les anticorps hybridés ont été révélés par chimiluminescence.

Puis l'intensité des bandes a été quantifiée par densitométrie (logiciel Collage V 4.0 software (Fotodyne Inc, New Berlin, WI)).

2.5- RT-PCR : mesure du taux de transcription du brin positif du VHC et du 18S

Les cellules 9-13 ont été mises en culture avec et sans interféron- α (Interferon from human leukocytes, Sigma Aldrich, St-Louis, MO) à la dose 500 U/ml, pendant 48 H, en triplicata à la concentration de 1 million de cellules par flasque de 75 cm².

Puis les ARN totaux ont été extraits avec du Trizol® (Gibco) selon le protocole conseillé par le manufacturier. Ces ARN ont été dosés au spectrophotomètre afin de déterminer leur concentration, selon la formule : dilution x (densité optique (D.O.)

mesurée à 260 nm – D.O. mesurée à 280 nm) /0.01. L'absorbance mesurée à 260 nm correspond à celles des acides nucléiques (ARN et ADN) tandis que celle mesurée à 280 nm correspond à celle des protéines. Enfin, la concentration des échantillons a été ajustée à 125 µg/ µl.

Les amorces utilisées pour le PCR sont dirigées contre le brin + du VHC et l'ARN ribosomal 18S. Ces amorces ont été établies par le programme « PRIMER » (Genetic Computer Group) et synthétisées par le groupe Sheldon de l'Université McGill de Montréal. Les amorces pour le 18S sont : 5'-TACCTGGTTGATCCTGCAGTA-3' et 5'-AATGGATCCTCGTTAAAGGATT-3'. Les amorces pour le brin + sont : 5'-CCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA-3' et 5'ACTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTAC-3'.

Pour le 18S : 250ng d'ARN ont été mélangé dans un tampon Tris 10 mM pH 8.3, contenant 1 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 100µg/ml d'albumine de sérum bovin, 100µM dNTPX, 1 µM d'amorces pour le 18S, 200U/ml d'inhibiteur de ARNase, 125 U/ml de transcriptase inverse AMV, 20 U/ml de Taq polymérase (Roche Diagnostics, Laval, Qc) et 20µCi/ml [α -³²P] dCTP. Les échantillons ainsi préparés sont alors soumis à 15 cycles identiques de : 50°C pendant 15 minutes puis amplification à 95°C pendant 30 secondes, 59°C pendant 1 minute et à 72°C durant 90 secondes.

Pour le brin positif du VHC, les cycles sont les mêmes, la seule différence est le nombre de cycle qui est de 30.

Après la réaction, les échantillons ont été déposés sur un gel d'électrophorèse à 8% d'acrylamide. Puis les gels ont été séchés et exposés pendant 2h pour le 18S et 4h pour le brin + sur film autoradiographique (Universal X-ray of Canada, Dorval, Qc). L'analyse densitométrique des bandes sur les films a été réalisée grâce à un scanner (Scanjet plus, Hewlet –Packard Canada Ltd, Mississauga, ON) et au logiciel Collage V 4.0 software (Fotodyne Inc, New Berlin, WI).

2.6- Analyses Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- erreur type et comparés selon le test de t pour valeur non pairées. Les différences entre groupes de données sont considérées significatives lorsque $P < 0,05$.

Résultats

1- Mesure de l'activité des caspases 3 et 8 dans des foies humains normaux et infectés par le virus de l'hépatite C

Les caspases sont des protéases spécifiques à l'apoptose. Elles sont activées par autoclivage. La caspase 8 est une caspase initiatrice car elle est active dans les premiers stades de l'apoptose, et sert à déclencher la cascade des caspases impliquées dans les voies de signalisation de Fas et TNF- α . D'un autre côté, la caspase 3 est une caspase effectrice, elle agit à la fin de la cascade des caspases.

L'activité de ces deux caspases mesurée dans les foies normaux et les foies infectés est très faible lorsque comparée aux contrôles positifs (figures 8 et 9). En effet, pour la caspase 3, la valeur est de $0,31 \pm 0,07$ unité de caspase 3 activée pour les foies normaux, et $0,95 \pm 0,43$ unité de caspase 3 activée pour les foies infectés, la différence entre ces deux groupes de foies n'étant pas significative. La valeur du contrôle positif (hépatocytes de souris soumis à une stimulation du récepteur Fas) est de $290,72 \pm 40,96$ unités de caspase 3 activée.

Pour la caspase 8, le résultat obtenu est de $1,87 \pm 0,59$ unités de caspase 8 activée pour les foies normaux, $1,61 \pm 0,41$ unités de caspase 8 activée pour les foies infectés tandis que le contrôle positif affiche une valeur de $42,95 \pm 7,71$ unités de caspase 8 activée. Encore une fois, il n'y avait pas de différence significative entre les foies normaux et les foies infectés.

Afin de vérifier que ces valeurs d'activité n'ont pas été causées par la présence d'un inhibiteur de l'activité caspase, une expérience utilisant une caspase 3 recombinante déjà clivée a été effectuée. Des extraits de foies normaux et infectés ont été mélangés à 150 unités de caspase 3 recombinante (RC3) chacun et comparés à un contrôle positif RC3 correspondant à 150 unités de caspase 3 activée. L'activité de la caspase 3 a été mesurée comme précédemment décrit.

Les résultats (figure 10) ne révèlent aucune inhibition de l'activation de la caspase 3, et ce, pour chacun des types d'échantillons. Il n'y a aucune différence significative entre les échantillons et le contrôle RC3.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pratiquement pas d'activité des caspases 3 et 8, que ce soit dans les échantillons normaux ou infectés. De plus, ceci n'est pas attribuable à une inhibition de l'activation des caspases, du moins, pour la caspase 3.

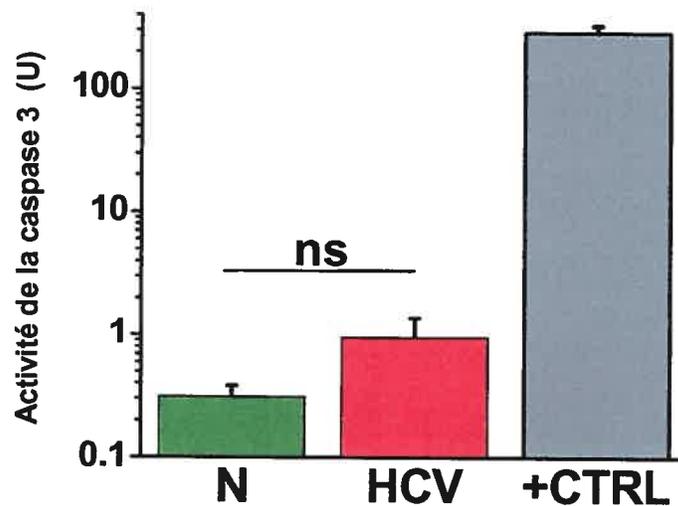


Figure 8 : Activité de la caspase 3 dans des foies normaux (N), infectés (VHC) et des hépatocytes de souris soumis à Fas (CTRL+). Les hépatocytes de souris ont été soumis à 250 ng/ml de Fas pendant 4 heures. L'activité de la caspase 3 est mesurée à l'aide d'un spectrofluoromètre et est exprimée en unités de caspase activée. n=10

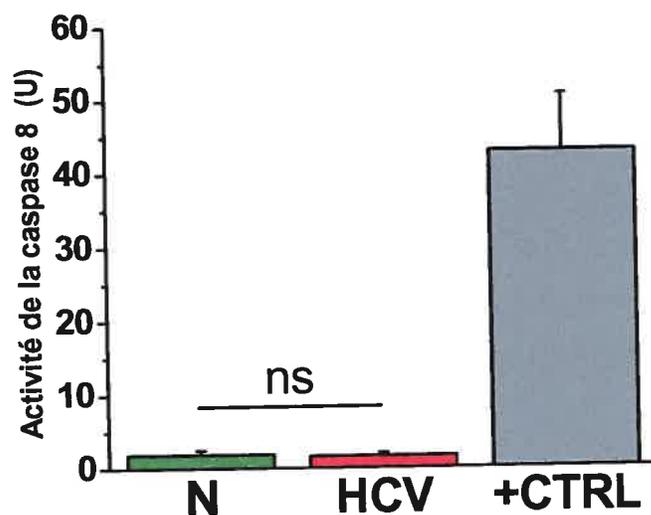


Figure 9 : Activité de la caspase 8 dans des foies normaux (N), infectés (VHC) et des hépatocytes de souris soumis à Fas (CTRL+). Les hépatocytes de souris ont été soumis à concentration de Fas pendant temps. L'activité de la caspase 8 est mesurée à l'aide d'un spectrofluoromètre et est exprimée en unités de caspase activée. n=10

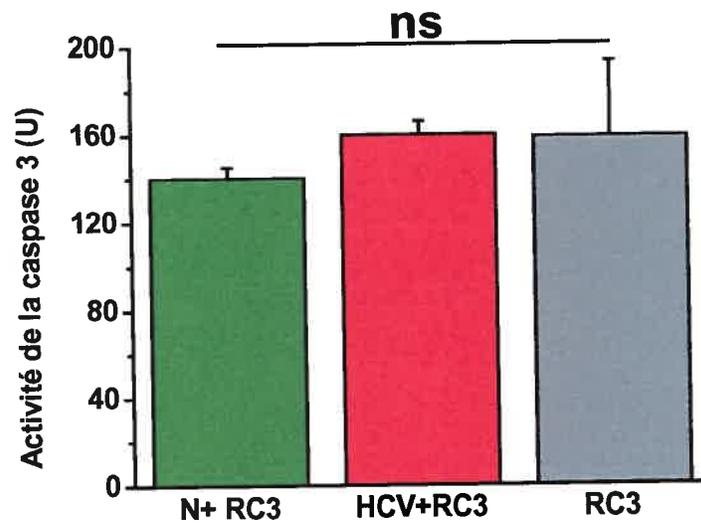


Figure 10 : Activité de la caspase 3 mesurée dans des foies normaux (N) auxquels a été ajouté 150 unités de caspase 3 recombinée (N+RC3) et infectés (VHC) auxquels a été ajouté 150 U de caspase 3 recombinée (HCV+ RC3) et des échantillons de 150 unités de caspase 3 recombinante activée (RC3) seule. L'activité de la caspase 3 est mesurée à l'aide d'un spectrofluoromètre et est exprimée en unités de caspase activée. n=4

2- Niveau d'expression de protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-x_L, Bax, Bid) et ratio Bax/Bcl-x_L dans des échantillons de foies humains normaux et infectés par le VHC

Les protéines de la famille de Bcl-2 tiennent le rôle de régulatrices du phénomène apoptotique. Certaines sont pro-apoptotiques comme Bax et Bid, d'autres sont anti-apoptotiques comme Bcl-x_L. C'est l'équilibre entre ces 2 catégories de protéines qui détermine la poursuite ou l'arrêt de la cascade de l'apoptose^(173,174, 175). Ainsi, la comparaison du niveau d'expression de ces protéines dans deux groupes d'échantillons permet d'évaluer l'état d'équilibre de la sensibilité des cellules à l'apoptose.

En premier lieu, le niveau d'expression de Bcl-x_L a été évalué afin de déterminer s'il est augmenté dans les foies infectés. Dans les foies normaux, le niveau d'expression de cette protéine est de $0,781 \pm 0,13$ u.a, alors que celui mesuré dans les foies infectés par le VHC est de $0,984 \pm 0,07$ u.a. Bien que Bcl-x_L soit plus fortement exprimé dans les foies infectés par rapport aux foies normaux, cette différence n'est pas statistiquement significative (figure 11).

Deuxièmement, les niveaux d'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et Bid ont été mesurés afin de vérifier s'ils sont diminués dans les foies infectés.

Pour Bax (figure 12), le niveau d'expression observé dans les foies normaux est de $1,5625 \pm 0,11$ u.a., alors que dans les foies infectés, il est plus élevé, sa valeur atteignait $1,925 \pm 0,14$ u.a.. La différence entre les deux groupes d'échantillons est significative ($P < 0.05$).

Par contre, pour la protéine Bid (figure 13), son niveau d'expression est plus faible dans les foies infectés ($0,294 \pm 0,027$) que les normaux ($0,332 \pm 0,023$), mais cette différence n'est pas significative.

Le ratio de Bax/Bcl-x_L a été déterminé dans les foies normaux et infectés (figure 14), à partir des résultats d'expression des protéines respectives obtenus ci-dessus. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les 2 groupes de foies ($1,61 \pm 0,14$ pour les foies normaux versus $1,71 \pm 0,33$ pour les foies infectés).

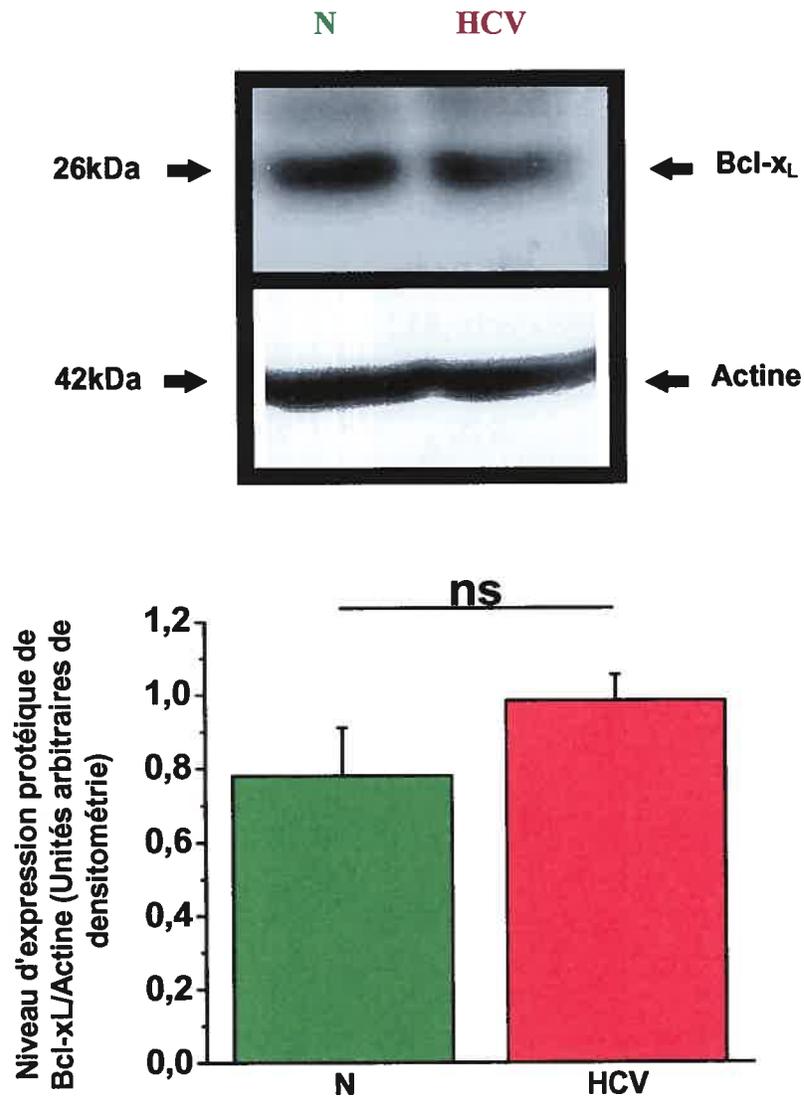


Figure 11 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC). L'expression protéique a été mesurée par Western Blot et exprimée en unités arbitraires de densitométrie.

Test de t $P > 0,05$ $n = 16$

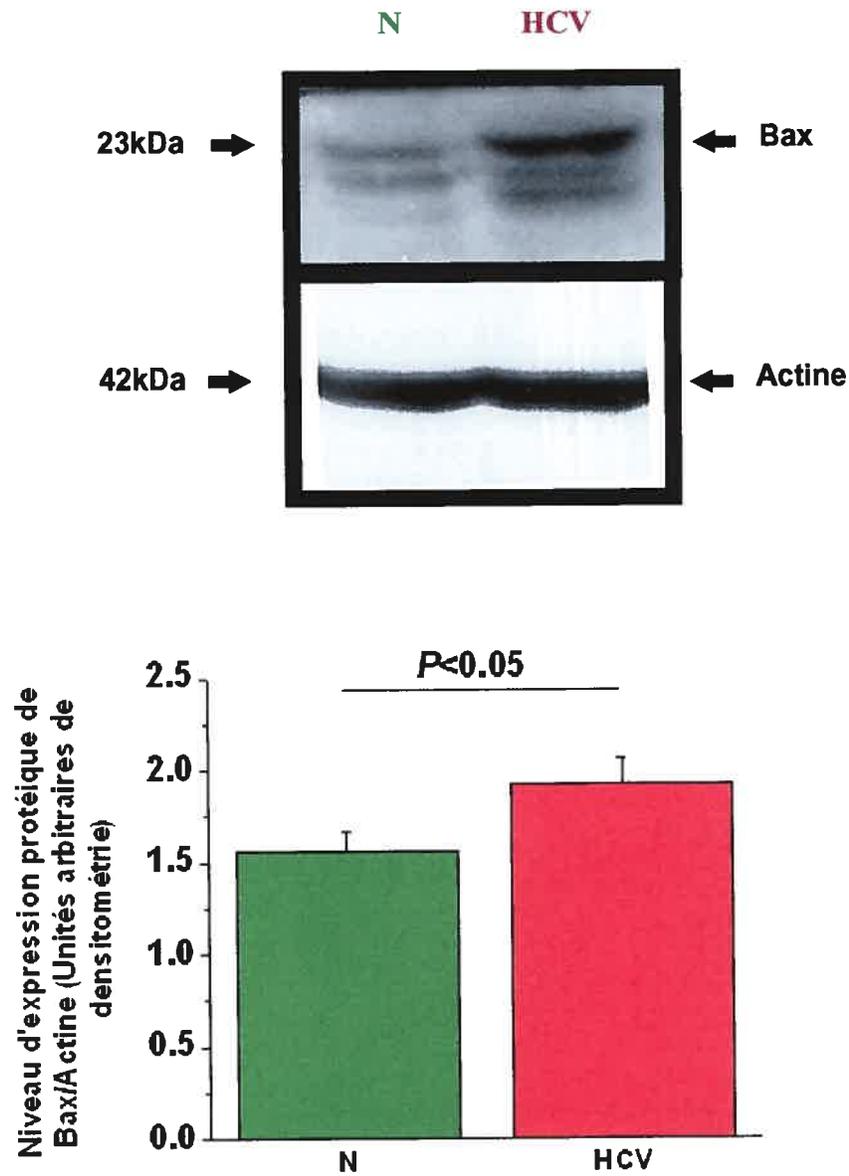


Figure 12 : Niveau d'expression de la protéine Bax dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC). L'expression protéique a été mesurée par Western Blot et exprimée en unités arbitraires de densitométrie.

Test de t $P<0.05$ $n=16$

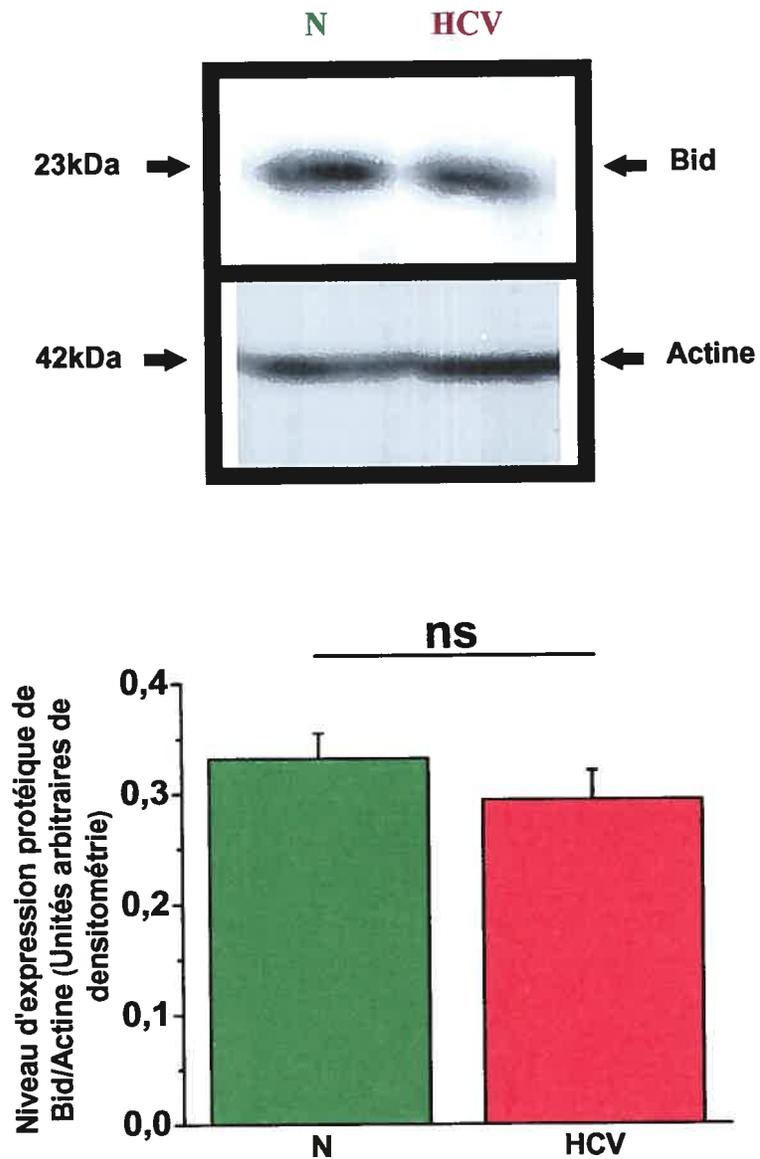


Figure 13 : Niveau d'expression de la protéine Bid dans des foies normaux (N) et des foies infectés par le VHC (VHC). L'expression protéique a été mesurée par Western Blot et exprimée en unités arbitraires de densitométrie.
Test de t $P > 0.05$ $n = 10$

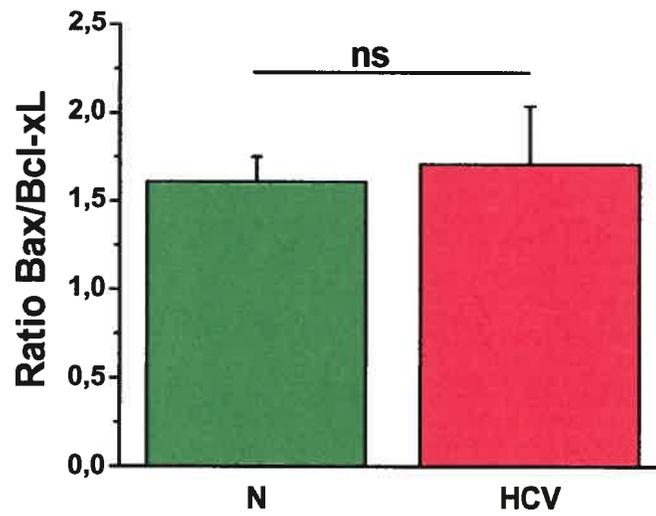


Figure 14 : Ratio de Bax/Bcl-x_L dans des foies normaux (N) et infectés par le VHC (VHC).
Test de t $P > 0.05$ n=16

3- Niveau d'expression de protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-x_L, Bax) et ratio Bax/Bcl-x_L dans les lignées de cellules 9-13 et HuH7

De la même façon que pour les échantillons de foies humains, des mesures du niveau d'expression de protéines de la famille Bcl-2 ont été effectuées au moyen de la technique de western blot sur les lignées cellulaires HuH7 et 9-13. Ces études sur les lignées ont pour but de vérifier si les observations faites sur les foies sont retrouvées dans un modèle différent de réplication virale au sein de cellules hépatiques et ainsi corroborer nos précédents résultats.

Les résultats obtenus démontrent que le niveau de Bcl-x_L est significativement supérieur dans les cellules 9-13 comparé aux HuH7 (respectivement 1.16 ± 0.15 vs 0.62 ± 0.02 , $P=0.005$) (figure 15).

De même pour Bax, cette protéine est plus exprimée dans la lignée 9-13 que la HuH7 et ceci de façon significative (0.67 ± 0.06 vs 0.4 ± 0.02 , $P=0.01$) (figure 16).

Par contre, le ratio Bax/Bcl-x_L (figure 17) n'est pas significativement différent entre les 2 lignées (0.63 ± 0.15 vs 0.74 ± 0.046 , $P=0.47$).

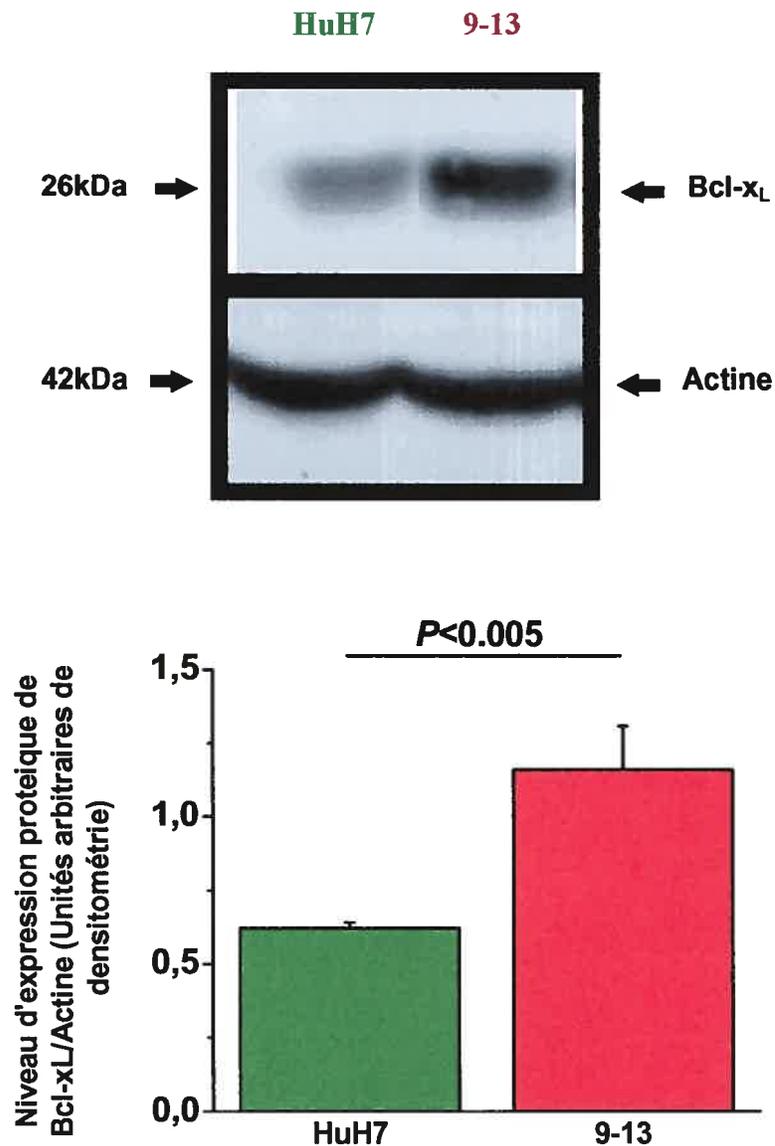


Figure 15 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C. L'expression protéique a été mesurée par Western Blot et exprimée en unités arbitraires de densitométrie.

Test de t $P < 0.005$ $n = 5$

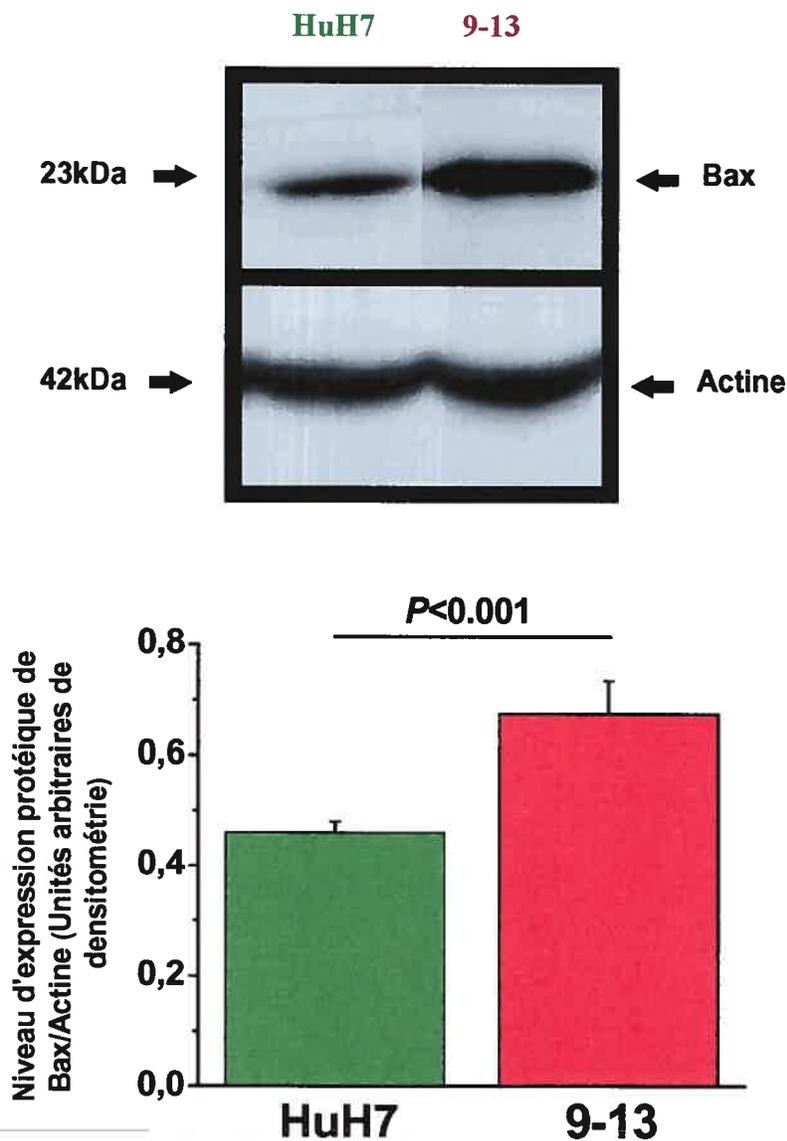


Figure 16 : Niveau d'expression de la protéine Bax dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C. L'expression protéique a été mesurée par Western Blot et exprimée en unités arbitraires de densitométrie.

Test de t $P<0.001$ $n= 5$

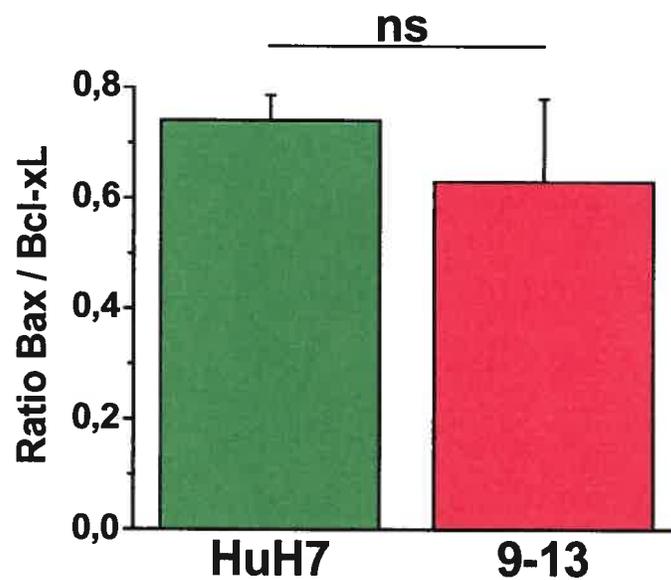


Figure 17 : Ratio de Bax/Bcl-x_L dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C.

Test de t $P > 0,05$ $n = 5$

4- Sensibilisation à la stimulation apoptotique dans les lignées HuH7 et 9-13

Le but de cette expérience est d'observer la réaction de chaque lignée vis-à-vis d'un stimulus apoptotique, afin de déterminer si le réplicon est capable ou non de conférer une résistance des cellules aux stimuli apoptotiques.

Le décompte des cellules en apoptose a été réalisé d'après des observations morphologiques. La figure 18A présente, à titre de référence, des hépatocytes murins en culture primaire colorés au Hoescht 33258. Les cellules considérées comme apoptotiques présentent une chromatine condensée autour de la membrane nucléaire (figure 18B), ou sont fragmentées en corps apoptotiques (figure 18C).



Figure 18 : Cellules de cultures primaires d'hépatocytes de souris colorées avec le fluorochrome Hoescht 33258. Les cellules sont préalablement fixées avec de la formaline 5%, lavées avec un tampon de PBS puis colorés par le Hoescht (0,25 μ g/ml). A) cellules normales, B) condensation de la chromatine, C) corps apoptotiques.

Pour observer le comportement des cellules Huh7 et 9-13 face à un stimulus apoptotique, divers moyens et conditions ont été utilisés.

Tout d'abord, l'apoptose a été induite par l'ajout de thapsigargine dans le milieu de culture des cellules. La thapsigargine est un puissant inhibiteur irréversible des pompes ATP Ca^{2+} dépendantes du réticulum endoplasmique. Lorsque ces pompes sont inhibées, le calcium du RE est relargué dans le cytoplasme, ce qui entraîne une élévation du taux de calcium intracellulaire. Cette perturbation de l'homéostasie calcique active les caspases 9 et 7 conduisant la cellule vers l'apoptose⁽²⁵⁵⁾.

La figure 19 représente l'effet de concentrations croissantes de thapsigargine sur les cellules des lignées HuH7 et 9-13 après 24 heures d'exposition. Le décompte de corps apoptotiques a été exprimé en pourcentage.

Les cellules 9-13 affichent un taux d'apoptose moins élevé que les HuH7, et ce, quelle que soit la dose de thapsigargine utilisée (valeurs comprises entre $1,59 \pm 0,159\%$ et $1,874 \pm 0,387\%$ de cellules HuH7 en apoptose comparées à des valeurs allant de $0,414 \pm 0,233\%$ à $0,854 \pm 0,261\%$ de cellules 9-13 en apoptose). De plus, la différence observée entre les 2 types de cellules est significative ($P < 0,05$ pour chaque concentration).

Puis, l'apoptose a été causée par une déprivation en sérum. La viabilité cellulaire a été évaluée par la réduction du MTT en formasan. La figure 20 présente le pourcentage de viabilité cellulaire après 48 heures de retrait de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture. Sans sérum, la viabilité des cellules HuH7 est réduite de 10,82 % tandis que celle des cellules 9-13 n'est réduite que de 2,16 % en 48 heures. La diminution de la survie des cellules HuH7 est significative ($P < 0,05$), tandis que celle des cellules 9-13 ne l'est pas.

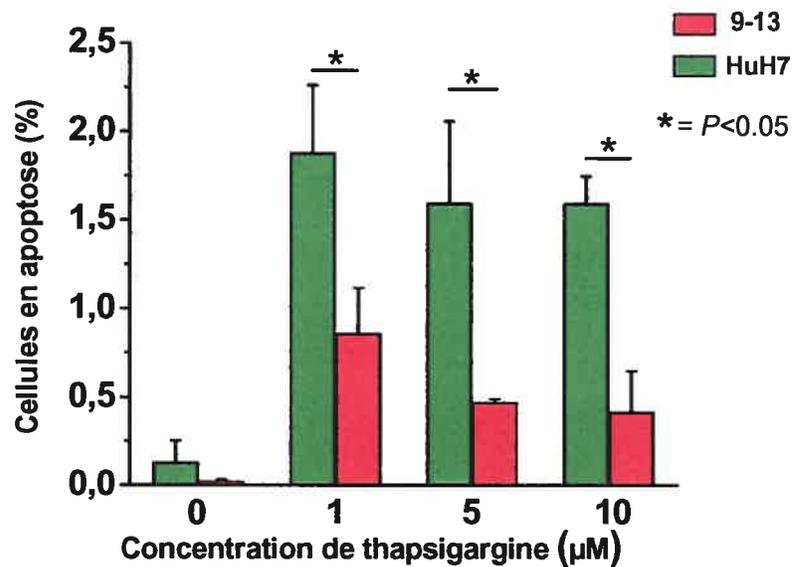


Figure 19 : Index apoptotique des cellules des lignées HuH7 et 9-13 en présence de concentrations croissantes de thapsigargine. Les cellules ont été cultivées à différentes concentrations de thapsigargine (0; 1; 5 ou 10 μM) pendant 24 heures. L'apoptose a été estimée par observation morphologique et décompte des cellules suite à une coloration au Hoescht 33258.

Test de t $P < 0.05$ $n = 3$

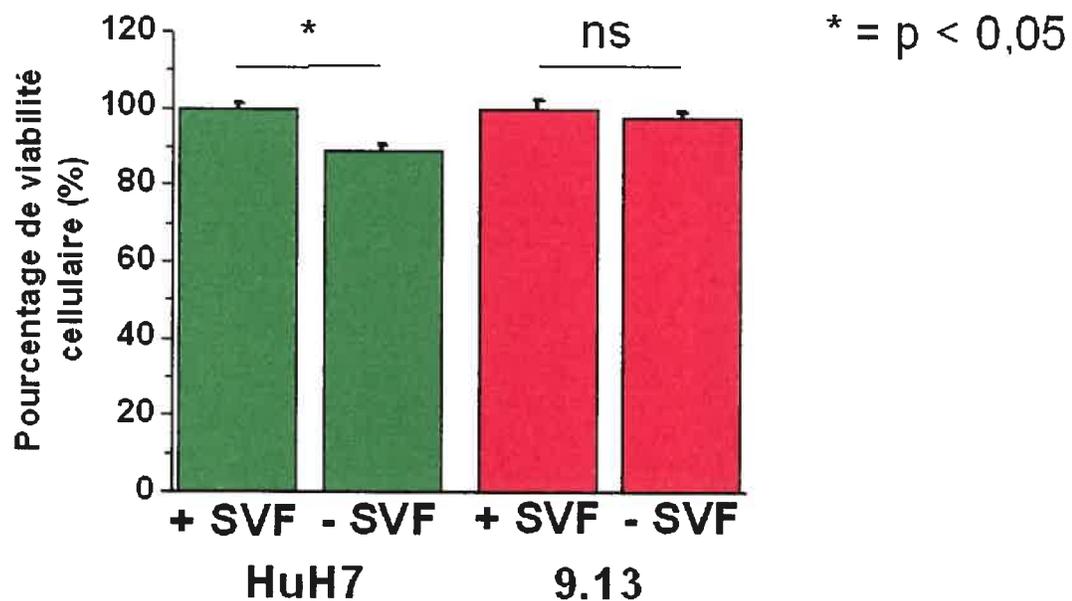


Figure 20 : Diminution de la viabilité suite à une déprivation en sérum fœtal de veau dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C. Les cellules ont été cultivées sans sérum fœtal de veau (SVF) pendant 48 heures. La viabilité a été mesurée par réduction du MTT en formazan et exprimée en pourcentage par rapport au contrôle. Test de t $P < 0.05$ $n = 8$.

5- Effets de l'interféron- α sur la réplication du réplicon et sur le niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L dans les lignées HuH7 et 9-13

L'IFN- α est utilisé pour diminuer la réplication virale du VHC. Nous l'avons utilisé afin de vérifier s'il inhibe la réplication du réplicon sous-génomique contenu dans les cellules 9-13 de façon à évaluer, par la suite, si la baisse de l'expression du réplicon est associée à une perte des modifications des niveaux d'expression protéiques observées préalablement.

Au moyen de RT-PCR semi-quantitative, il a été montré que la quantité d'ARN du brin positif du réplicon est fortement diminuée en présence de 500U/ml d'interféron- α pendant 48 heures (figure 21). Les résultats montrent que le niveau de réplication du réplicon, en présence d'interféron- α , passe de $2,277 \pm 0,105$ u.a. à $0,806 \pm 0,106$ u.a.

Pour vérifier que cette baisse de la réplication est liée ou non au niveau d'expression de protéines de la famille Bcl-2 nous avons mesuré le niveau d'expression de Bcl-x_L en présence d'interféron- α (figure 22).

Le niveau d'expression de Bcl-x_L n'est pas significativement différent dans la lignée HuH7 et ce, qu'elle soit en présence d'IFN- α ou non ($1,474 \pm 0,064$ u.a. et $1,525 \pm 0,075$, $P < 0,05$). Ce qui indique que l'expression de la protéine Bcl-x_L n'est pas influencée par la présence d'IFN- α .

Le niveau d'expression de Bcl-x_L est significativement plus élevé dans la lignée 9-13 par rapport à la parentale ($1,660 \pm 0,014$ u.a. et $1,474 \pm 0,064$ u.a., $P < 0,05$) ce qui corrobore les résultats précédemment obtenus.

Les résultats montrent que le niveau d'expression de Bcl-x_L est significativement diminué dans les cellules du réplicon (9-13) traitées à l'IFN- α par rapport aux cellules 9-

13 non traitées (sans IFN- α : $1,660 \pm 0,014$ u.a. et $1,525 \pm 0,038$ u.a. avec IFN- α , $P < 0,05$).

Puisque la baisse d'expression de la protéine Bcl-x_L n'est pas retrouvée dans la lignée HuH7, ceci indique que le niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L est en partie dépendant de celui de la réplication du réplicon.

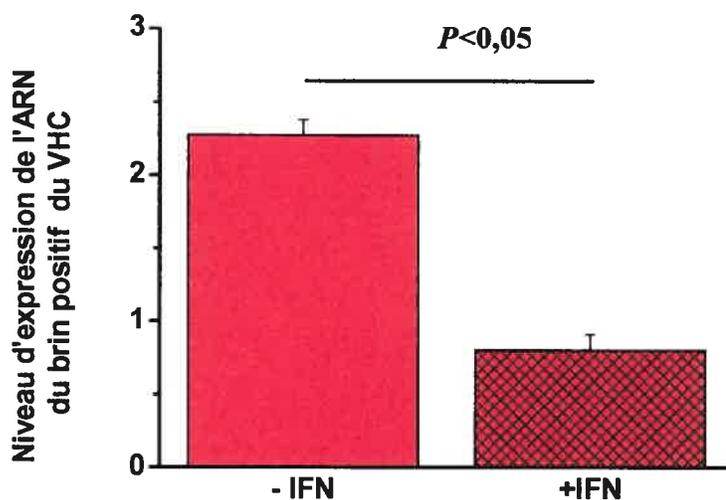


Figure 21 : Niveau d'expression de l'ARN du brin positif du VHC dans la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C avec (+ INF) ou sans (-INF) interféron- α . Les cellules ont été soumises à 500 U/ml d'interféron- α pendant 48 heures. L'expression de l'ARNm est mesurée par RT-PCR et exprimée en unité arbitraire de densitométrie.

Test de t, $P < 0,05$, $n=3$

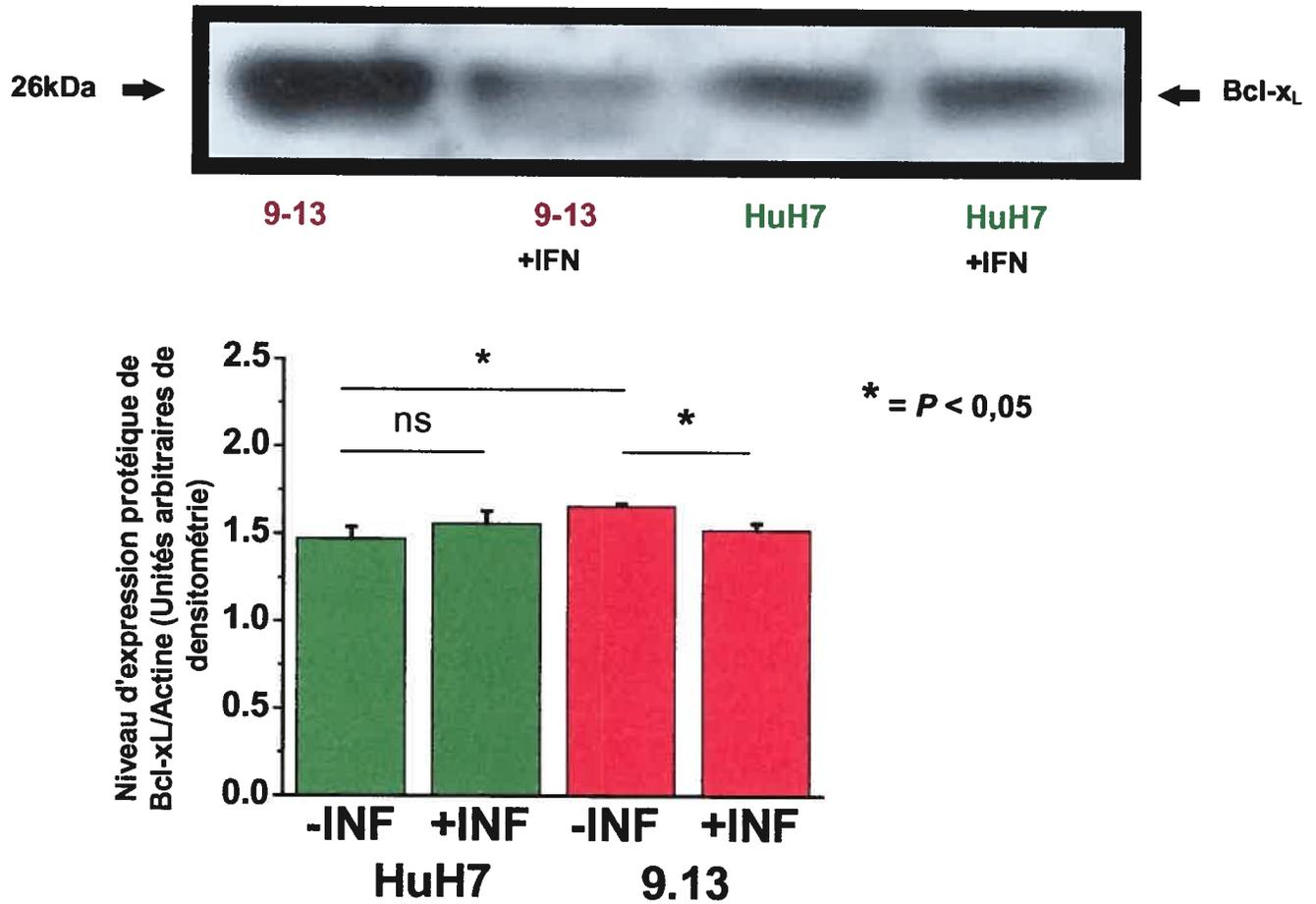


Figure 22 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L dans la lignée la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C avec ou sans interféron- α . Les cellules on été cultivées avec 500U/ml d'interféron- α pendant 48 heures. L'expression protéique a été mesurée par Western Blot.

n=3

6- MAPK

La voie des MAP kinases est une voie de signalisation qui module le mécanisme apoptotique de façon négative : elle est souvent activée dans les cellules cancéreuses. Les MAP kinases ERK1 et 2 sont impliquées dans la phosphorylation de Bcl-2. Les MAPK induisent l'expression de certaines protéines dont Bcl-x_L^(256,257,258,259,260,261).

Les MAP kinases sont activées par phosphorylation, ce qui les fait phosphoryler et activer Bcl-2 dans certaines lignées. Dans les hépatocytes, Bcl-x_L est la molécule anti-apoptotique prévalente. Puisque la lignée 9-13 est plus résistante à l'apoptose que la HuH7 et que ceci est associé à une augmentation du niveau d'expression des protéines de la famille Bcl-2, nous avons voulu déterminer si cette résistance est médiée par cette voie.

Les protéines de la voie des MAPK sont activées par phosphorylation en présence d'EGF. Les cellules HuH7 et 9-13 ont été cultivées avec et sans EGF. La figure 23 montre qu'en présence d'EGF, ERK1 et ERK2 sont plus fortement activées dans les cellules 9-13 que les HuH7.

Le PD98059 est un inhibiteur des MAPK. Il inhibe leur phosphorylation par les MAP kinase kinases⁽²⁶²⁾. Les cellules 9-13 ont été cultivées avec ou sans cet inhibiteur afin de voir si cela a une influence sur l'expression protéique de Bcl-x_L et Bax. La figure 24 montre que l'ajout de PD98059 diminue l'expression de Bcl-x_L chez les cellules 9-13 ($4,365 \pm 0,902$ versus $1,14 \pm 0,175$ u.a. soit une diminution de 73,9%, $P < 0,05$).

Pour l'expression de la protéine Bax, elle est aussi diminuée de 17,67%, mais cette baisse n'est pas significative (figure 25).

Donc, en présence d'inhibiteur des MAP kinases, seule l'expression de Bcl-x_L est modifiée. Lorsque les MAP kinases sont inhibées, Bcl-x_L voit son expression diminuer, ce qui suggère que les MAP kinases agissent en amont de Bcl-x_L.

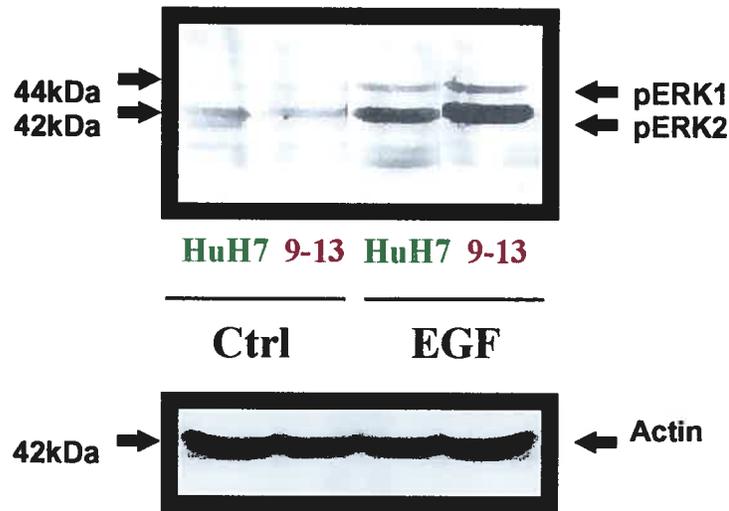


Figure 23 : Niveau d'expression des protéines phosphorylées ERK1 et ERK2 dans la lignée cellulaire HuH7 et la lignée 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C avec ou sans EGF. Les cellules ont été cultivées avec ou sans 50ng/ml de EGF. L'expression protéique a été mesurée par Western Blot.

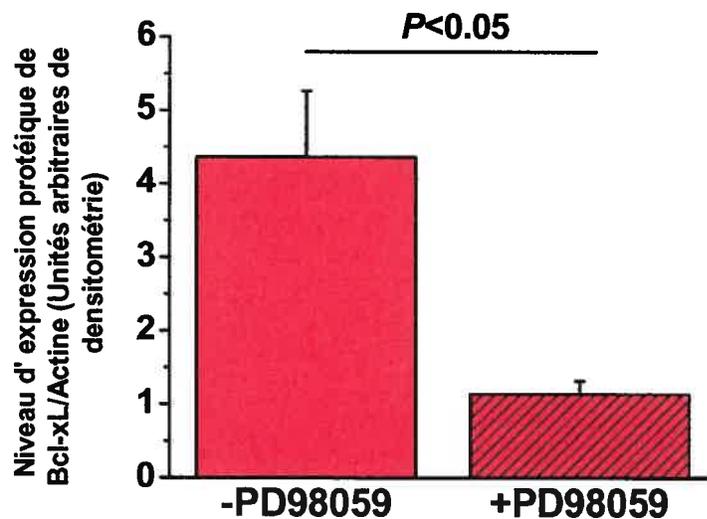


Figure 24 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L dans la lignée cellulaire 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C cultivée avec ou sans PD98059. Les cellules ont été soumises à 25μM de PD98059 pendant 48 heures. L'expression protéique a été mesurée par Western Blot et exprimée en unités arbitraires de densitométrie.

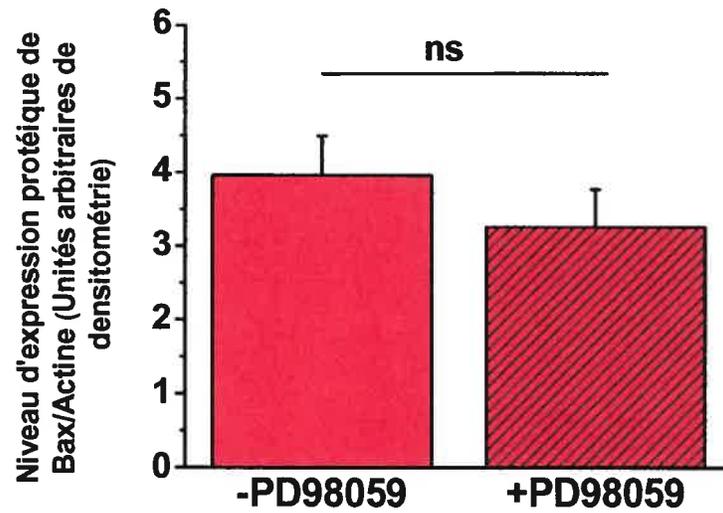


Figure 25 : Niveau d'expression de la protéine Bax dans la lignée cellulaire 9-13 contenant un réplicon sous-génomique du virus de l'hépatite C cultivée avec ou sans PD98059. Les cellules ont été soumises à 25 μ M de PD98059 pendant 48 heures. L'expression protéique a été mesurée par Western Blot et exprimée en unités arbitraires de densitométrie.

Discussion

Le but de cette étude était de déterminer si les hépatocytes infectés par le VHC sont plus résistants à l'apoptose que les hépatocytes non infectés, ce qui pourrait expliquer en partie la persistance de l'infection dans le contexte d'une réponse immunitaire induite par le virus.

Pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles différents d'étude et avons analysé différentes protéines impliquées dans l'apoptose.

Le VHC n'induit pas d'activation des caspases 3 et 8 dans les foies humains :

Il y a de plus en plus de preuves que les lésions hépatiques induites lors de l'infection par le VHC se produisent par apoptose⁽¹⁴⁵⁾. Cependant, l'implication des caspases et leur rôle spécifique dans la pathogenèse du VHC ne sont pas connus. Les caspases sont les principales protéines exécutrices de l'apoptose. Dans notre étude, nous avons mesuré l'activation des caspases 8 (activatrice) et 3 (effectrice) dans des échantillons de foies humains normaux et dans des foies infectés par le VHC.

Nos résultats ne montrent pas d'activité significative de ces deux caspases dans les deux catégories de foies testées. Ces résultats sont tout à fait concordants avec le fait que très peu d'apoptose est décelable dans les foies sains adultes en temps normal^(137, 138).

Par contre, en ce qui concerne les foies infectés, le résultat peut paraître surprenant. En effet, les foies infectés utilisés proviennent de patients en attente de greffe où la pathologie est donc très avancée. Il serait donc tout à fait logique de s'attendre à mesurer une activité des caspases plus élevée dans les foies infectés que celle trouvée dans les foies normaux.

De plus, ce résultat est à l'opposé de ceux de Bantel *et al.*^(145, 263) qui, lui, trouve que l'activation des caspases est significativement plus forte dans les foies infectés (7 à 20%) et proportionnelle à l'atteinte hépatique.

Une cause de cette discordance de résultats pourrait s'expliquer par les techniques utilisées. Notre méthode mesure le clivage des substrats des caspases, tandis que Bantel a utilisé des westerns blot pour mesurer les niveaux protéiques des formes clivées, supposément actives, des caspases 3 et 7.

Nous ne pouvons pas conclure que notre technique n'a pas fonctionné puisqu'un témoin positif infirme cette hypothèse. Néanmoins, elle n'est peut être pas adéquate à notre type d'échantillons.

Cependant, les résultats émis par Bantel sont discutables : les caspases clivées ne sont pas forcément toutes actives, et pourraient être en partie inhibées. Étant donné que les caspases peuvent être activées pour d'autres fonctions que l'apoptose, (comme le contrôle du cycle cellulaire, la prolifération des cellules T, la différenciation cellulaire de certaines cellules)^(264,265), il est possible que l'apoptose puisse avoir été surévaluée par son type de technique.

Pour éclaircir ce point, il faudrait réaliser nos mesures avec la même technique que Bantel afin de comparer nos résultats avec ceux-ci et ainsi les confirmer ou les infirmer.

Afin de mieux interpréter nos résultats, nous avons voulu vérifier si les caspases n'étaient pas inhibées dans les foies infectés, ce qui pourrait expliquer pourquoi les caspases ne sont pas activées dans les échantillons infectés.

Aucune inhibition de l'activité caspase 3 n'a pu être décelée dans nos échantillons infectés. À moins que le seuil de sensibilité de notre mesure soit inadéquat, ceci suggère que les caspases (du moins la caspase 3) ne sont, ni activées, ni inhibées, dans nos foies qu'ils soient infectés ou non. Il faut, ici, souligner que l'absence d'activité caspase significative ne s'oppose pas à la présence d'un certain niveau d'apoptose dans ces foies. Il est d'ailleurs possible que le phénomène apoptotique qui a lieu dans les foies soit

caspase- indépendant. En effet, il a été rapporté qu'il existe des morts cellulaires caspase indépendantes qui ne correspondent pas à de la nécrose⁽²⁶⁶⁾.

Néanmoins, nos résultats concordent avec notre hypothèse et suggèrent que les cellules de foies infectés sont résistantes à l'apoptose puisqu'elles présentent le même profil d'activation des caspases que celles des foies normaux.

Le VHC et le réplicon sous-génomique modulent des protéines pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Les protéines de la famille Bcl-2 sont régulatrices de l'apoptose. Bcl-x_L est la protéine anti-apoptotique principale dans les hépatocytes, où l'on ne retrouve pas Bcl-2⁽²⁶⁷⁾.

Nos résultats indiquent que Bcl-x_L est plus exprimée dans les foies infectés que dans les foies normaux mais pas de manière statistiquement significative. Ce résultat est dû en partie à la forte erreur-type des échantillons normaux : comme ces spécimens proviennent de foies où s'est développée une tumeur, il est possible que ce type d'échantillon ne soit pas totalement normal.

Il est aussi possible que cela soit dû au fait qu'il existe plusieurs types de cellules au sein du foie, et que seuls les hépatocytes sont les cellules cibles du virus et sont soumises à ses effets. Le fait d'étudier l'expression protéique d'un échantillon de foie dilue ce que nous devrions mesurer dans un seul type cellulaire. Aussi, il est envisageable que la présence d'une grande quantité de tissu cicatriciel fibreux puisse avoir une influence sur le niveau d'expression protéique dans les foies pathologiques. C'est pourquoi cette mesure de l'expression de Bcl-x_L devrait être refaite dans des hépatocytes isolés (culots d'hépatocytes isolés de foies infectés, lignée primaire d'hépatocytes, lignées cellulaire d'hépatocytes, etc.).

Nous nous sommes aussi intéressés au niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bid, afin d'observer si cette protéine est sous-exprimée dans les foies infectés.

Son expression est la même dans les deux types d'échantillons ($0,294 \pm 0,027$ foies infectés versus $0,332 \pm 0,023$ foies normaux). La tendance observée est une légère baisse du niveau d'expression dans les foies infectés.

Mais il est difficile d'interpréter ceci, puisque Bid est la forme inactive de la protéine : après clivage elle devient t-Bid. La baisse de la quantité de Bid pourrait être causée par une activation de celui-ci et donc son clivage en t-Bid ou bien par une baisse de sa transcription. Il faudrait donc compléter cette expérience avec des mesures du niveau d'expression de t-Bid et effectuer des ratios d'expression de Bid/t-Bid ce qui permettrait de savoir si Bid est plus activé ou non dans les foies sains et infectés.

Le niveau d'expression de la protéine Bax a aussi été évalué dans les foies normaux et infectés. Nos résultats montrent que cette protéine est surexprimée de façon significative dans les foies infectés comparés aux foies sains ($0,5625 \pm 0,11$ foies normaux versus $1,925 \pm 0,14$ foies infectés).

Ceci est contraire à ce que nous prévoyions, puisque Bax aurait du être sous-exprimé dans nos échantillons infectés par le VHC. Donc, à priori, cela signifierait que cette hausse de Bax soit associée à une plus grande sensibilité à l'apoptose dans les foies infectés.

Or, c'est la balance entre les protéines pro et anti-apoptotiques qui détermine s'il va y avoir mort cellulaire ou pas. Le ratio Bcl-2/Bax ou Bcl-x_L/Bax, selon le type cellulaire, sert de référence pour établir vers quelle issue (mort ou survie) la cellule s'oriente⁽¹⁷⁰⁾. Nous avons donc calculé le ratio Bax /Bcl-x_L.

Il s'avère que le ratio n'est pas significativement différent dans les deux groupes. Ceci signifie que dans les foies normaux et infectés, la balance apoptotique est la même,

et puisque les cellules de foies normaux ne sont pas soumis à une stimulation apoptotique, par ricochet celles des foies infectés sont dans la même état de sensibilité. La hausse du niveau d'expression de Bax n'a alors plus autant d'impact sur l'apoptose, puisqu'elle est contrebalancée par Bcl-x_L.

Les mêmes mesures de niveau d'expression de membres de la famille Bcl-x_L ont été réalisées sur les lignées cellulaires HuH7 et 9-13. Ces études permettent d'obtenir des résultats en ne tenant compte que des effets du réplicon en éliminant ceux provenant d'autres paramètres pouvant avoir de l'influence (comme les cellules immunitaires, les autres types cellulaires, l'organisme etc.).

Le niveau d'expression de Bcl-x_L dans la lignée 9-13 (contenant le réplicon du VHC) est nettement supérieur à celui trouvé dans la lignée HuH7. (1.16 ± 0.15 pour les 9-13 versus 0.62 ± 0.02 chez les HuH7). Cette expérience suggère donc que l'augmentation de Bcl-x_L observée dans les foies infectés et les cellules contenant le réplicon est donc imputable au réplicon sous-génomique et, de plus, confirme la tendance observée *ex-vivo* dans les échantillons de foies.

Ceci corrobore les résultats obtenus par Otsuka ⁽²²⁹⁾, qui montrent que dans les cellules HepG2, la protéine Core du VHC induit une surexpression de Bcl-x_L qui permet d'inhiber l'apoptose). Cependant notre réplicon ne contient pas la séquence qui code pour la protéine Core. Ceci suggère que l'augmentation de l'expression de Bcl-x_L pourrait être liée à plusieurs séquences du génome du VHC (dont Core et au moins une parmi celles contenues dans le réplicon), ou bien que cet effet est spécifique à la lignée (Core pour les HepG2, et une autre séquence pour les HuH7 contenant le réplicon).

Pour la protéine Bax, son niveau d'expression est significativement supérieur dans la lignée 9-13 par rapport à la lignée HuH7. (0.67 ± 0.06 vs 0.4 ± 0.02 , $P=0.01$). Ceci confirme les résultats observés dans les foies humains. Cette surexpression est elle aussi « due » au réplicon et semble contraire à l'hypothèse de recherche. Mais, là encore, nous avons calculé le rapport Bax/Bcl-x_L et le résultat montre, comme auparavant dans les

foies, qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux lignées cellulaires (0.63 ± 0.15 pour les 9-13 vs 0.74 ± 0.046 pour les HuH7, $P=0,47$). La surexpression de Bax est contrecarrée par celle de Bcl-x_L ou l'inverse. Là encore, les hépatocytes contenant le réplicon ne seraient pas plus enclin à l'apoptose que les autres.

Il semble donc que, à la fois dans les échantillons de foies et dans les lignées cellulaires, le virus ou le réplicon induisent des modifications d'expression des protéines de la famille Bcl-2 et que celles-ci maintiennent les cellules en état non apoptotique.

Mais ces résultats n'indiquent pas que les hépatocytes infectés sont plus résistants à l'apoptose en tant que tel. Ils indiquent simplement qu'ils ne sont pas plus en apoptose que les sains, et surtout beaucoup moins qu'ils ne sont censés l'être (en particulier dans les foies, où ces cellules sont les cibles du système immunitaire et devraient donc afficher des caractéristiques pro-apoptotiques évidentes, caractéristiques que nous n'avons pas retrouvées). Le fait que les échantillons infectés ne présentent pas un profil apoptotique peut être indirectement considéré comme une résistance à l'apoptose.

La lignée 9-13 contenant le réplicon sous-génomique du VHC est plus résistante à l'apoptose que la lignée HuH7.

Pour vérifier notre hypothèse de résistance à l'apoptose, nous avons placé les cellules des deux lignées en situation apoptotique afin d'observer si le réplicon est capable de conférer un comportement de résistance à la lignée 9-13.

Tout d'abord, nous avons induit l'apoptose au moyen d'un retrait en sérum dans le milieu de culture. La carence en sérum entraîne une diminution de la synthèse protéique et l'arrêt du cycle cellulaire⁽²⁶⁸⁾, ce qui entraîne l'apoptose.

Puis, l'apoptose a été induite par ajout de thapsigargine. La thapsigargine est un puissant inhibiteur irréversible des pompes ATP Ca²⁺ dépendantes du réticulum endoplasmique. Lorsque ces pompes sont inhibées, le calcium du RE est relargué dans le cytoplasme, ce qui entraîne une élévation du taux de calcium intracellulaire. Cette

perturbation de l'homéostasie calcique active les caspases 9 et 7 conduisant la cellule vers l'apoptose⁽²⁵⁵⁾.

Dans les deux situations, la lignée 9-13 a montré une résistance accrue à l'apoptose. ($P < 0,05$; différence significative observée pour chaque concentration de thapsigargine testée entre les cellules parentales et celles du réplicon).

Ces résultats confirment nos résultats précédents et soutiennent notre hypothèse initiale. Néanmoins, il serait important de tester si cette résistance est aussi observable dans d'autres conditions d'apoptose, avec d'autres stimuli. (UVC, staurosporine, TGF- β etc.).

De même, il serait indiqué de réaliser ces expériences avec le réplicon génomique du VHC afin de tenir de tous les produits des gènes du virus et ainsi se rapprocher le plus possible de ce qui se passe in vivo.

L'IFN- α inhibe la réplication du réplicon et diminue l'expression de Bcl-x_L dans la lignée 9-13 mais pas dans la lignée HuH7.

Lorsque les deux lignées cellulaires ont été soumises à l'interféron- α , une baisse de la réplication du réplicon a été mise en évidence chez les 9-13. Parallèlement à cette diminution de la réplication, l'expression de Bcl-x_L a elle aussi diminué chez les 9-13 tandis que le niveau d'expression de Bcl-x_L est augmenté chez les HuH7.

Cela confirme que le réplicon contrôle en partie le niveau d'expression de Bcl-x_L puisque ce dernier varie selon le taux de réplication virale. Nous aurions pu croire que cette baisse de Bcl-x_L ait pu être induite par l'interféron puisqu'il est connu que ce dernier agit sur des nombreux gènes appelés ISG (Interferon stimulated genes)⁽²⁶⁹⁾.

Mais, le fait que Bcl-x_L n'ait pas diminué dans la lignée HuH7 montre que sa baisse d'expression protéique n'est pas due à l'interféron- α , mais bien à la diminution de la réplication.

La hausse du niveau d'expression de Bcl-x_L serait causée par une activation de la voie des MAPkinases.

Des expériences préliminaires indiquent qu'en présence d'EGF, les MAP kinases ERK1 et ERK2 sont plus activées (par phosphorylation) dans la lignée 9-13 que la HuH7, alors que sans EGF l'activation est sensiblement la même dans les deux lignées.

La voie des MAP kinases est une voie de survie qui est fréquemment activée dans les cellules cancéreuses, et donc résistantes à l'apoptose.

En présence de PD 98059, un inhibiteur de l'activation des MAP kinases, le niveau d'expression de Bcl-x_L est significativement diminué alors que celui de Bax ne l'est pas. Il semblerait donc que l'expression de la protéine Bcl-x_L soit dépendante de l'activation/phosphorylation des MAP kinases.

Ces résultats préliminaires suggèrent que certaines protéines virales stimulent l'activation de la voie des MAP kinases et que cela engendre une augmentation de l'expression de la protéine Bcl-x_L qui, elle, permettrait de maintenir les cellules dans un état non apoptotique. Plusieurs études ont montré aussi que la voie de signalisation ERK1/2 est impliquée dans l'expression de la protéine Bcl-x_L^(229, 270, 271). Récemment, il a été montré que ERK1/2 augmente l'expression de Bcl-x_L via une inhibition de l'activité des caspases⁽²⁵⁷⁾.

Pour approfondir cette étude, il serait intéressant de prouver que la résistance à l'apoptose est bien due au réplicon et non pas à une adaptation de la lignée 9-13. Ceci peut être effectué en réalisant une expérience de cure du réplicon au moyen de l'interféron- α . Une fois le réplicon éliminé dans la lignée 9-13, il faudrait alors répéter des expériences d'induction de l'apoptose et observer si la résistance est abolie ou pas.

De même, il faudrait remesurer le niveau d'expression de Bcl-x_L, afin de voir s'il est devenu similaire à celui trouvé chez les HuH7, et faire de même pour les niveaux d'expression des formes activées des MAP kinases ERK1/2.

Il serait aussi indiqué de mesurer la sensibilité des cellules 9-13 à la stimulation apoptotique en présence de l'inhibiteur PD98059 puisque celui-ci induit une baisse des niveaux d'expression de Bcl-x_L.

Afin de se rapprocher de la réalité, des expériences devraient aussi être effectuées avec des cultures primaires d'hépatocytes infectés par le VHC, ainsi qu'une lignée cellulaire contenant le réplicon génomique du VHC.

Perspectives :

Nos résultats sont en accord avec notre hypothèse initiale, ils soulignent l'importance de la résistance à l'apoptose induite par le VHC pour sa survie et celle de son hôte. Le VHC déjoue le système immunitaire grâce à ce mécanisme, ce qui témoigne d'une adaptation sophistiquée du virus à son milieu.

Conclusion

Nos expériences ont montré que les foies infectés par le VHC ne sont pas le site d'une activité apoptotique intense. Nous n'avons pas observé d'activation de caspases 3 et 8, et le ratio Bax/Bcl-x_L n'est pas significativement différent de celui mesuré dans les foies normaux en dépit d'une augmentation du niveau d'expression de Bax. Les résultats recueillis à partir des lignées cellulaires 9-13 et HuH7 ont confirmé les résultats précédemment obtenus dans les foies. En effet, le réplicon et, par conséquent, les protéines virales influent sur le niveau d'expression protéique des membres de la famille Bcl-2, dont Bcl-x_L et Bax. Ces modifications ne modifient pas le ratio Bax/Bcl-x_L.

En présence d'une stimulation apoptotique les cellules 9-13 se sont révélées plus résistantes à l'apoptose que les HuH7. Lors de l'inhibition de la réplication du réplicon par l'interféron- α , le niveau de Bcl-x_L a été nettement diminué dans la lignée 9-13 contrairement à la lignée HuH7 sous interféron.

Le réplicon est aussi associé à une plus grande sensibilité de la voie des MAP kinases ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de Bcl-x_L et qui permettrait de maintenir les cellules en état non apoptotique.

Le rôle de l'apoptose dans la genèse des lésions hépatiques n'est pas clair. In vitro les hépatocytes apoptotiques relarguent leurs transaminases, in vivo le même phénomène a lieu, mais il est moins évident, car les débris cellulaires sont éliminés. La mesure du taux de relarguage des transaminases est utilisée pour définir les hépatites chroniques. Pourtant, 15 à 50% des patients infectés chroniquement ont un taux normal persistant d'ALT^(272,273,274). De plus, le niveau d'ALT est variable et non proportionnel aux lésions hépatiques. Ce qui suggère que le niveau de relarguage des transaminases hépatiques ne reflète pas le niveau d'apoptose ni de lésions hépatiques in vivo.

Ces résultats pourraient apporter des éléments d'explication des mécanismes de chronicité de l'infection par le VHC et par extension du risque associé de carcinome hépatocellulaire, et ainsi fournir de nouvelles cibles pour la recherche thérapeutique.

Bibliographie

1. MacCallum FO. Early studies of viral hepatitis. *Br Med Bull* 1972; 28:105-8.
2. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama* 1965; 191:541-6.
3. Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang* 1968; 15:374-85.
4. Lander JJ, Alter HJ, Purcell RH. Frequency of antibody to hepatitis-associated antigen as measured by a new radioimmunoassay technique. *J Immunol* 1971; 106:1166-71.
5. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182:1026-8.
6. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292:767-70.
7. Prince AM, Brotman B, Grady GF, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 1974; 2:241-6.
8. Mosley JW, Redeker AG, Feinstone SM, Purcell RH. Multiple hepatitis viruses in multiple attacks of acute viral hepatitis. *N Engl J Med* 1977; 296:75-8.
9. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244:362-4.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-62.
11. Hepatitis C: global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72:341-4.
12. Zou S, Tepper M, Giulivi A. Current status of hepatitis C in Canada. *Can J Public Health* 2000; 91 Suppl 1:S10-5, S10-6.
13. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996; 334:1691-6.
14. Nilsson D, Hansson LE, Johansson K, Nystrom C, Paalzow L, Aquilonius SM. Long-term intraduodenal infusion of a water based levodopa-carbidopa dispersion in very advanced Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1998; 97:175-83.
15. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, et al. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997; 337:237-40.
16. Management of hepatitis C. NIH Consensus Statement 1997; 15:1-41.
17. Semprini AE, Persico T, Thiers V, et al. Absence of hepatitis C virus and detection of hepatitis G virus/GB virus C RNA sequences in the semen of infected men. *J Infect Dis* 1998; 177:848-54.
18. Zuccotti GV, Cucchi C, Torcoletti M, et al. Proposal of a step-wise follow-up for hepatitis C seropositive mothers and their infants. *Pediatr Med Chir* 2003; 25:6-11.
19. EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement. *J Hepatol* 1999; 31 Suppl 1:3-8.

20. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004; 12:96-102.
21. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:6547-9.
22. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 1999; 107:10S-15S.
23. Hepatitis C. Seroprevalence of hepatitis C virus (HCV) in a population sample. *Wkly Epidemiol Rec* 1996; 71:346-9.
24. Farci P, Alter HJ, Wong D, et al. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 325:98-104.
25. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358:958-65.
26. Michielsen P, Brenard R, Reynaert H. Treatment of hepatitis C: impact on the virus, quality of life and the natural history. *Acta Gastroenterol Belg* 2002; 65:90-4.
27. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975-82.
28. Franciscus A. Managing HCV treatment side effects, version 2.0, 2003:http://www.hcvadvocate.org/hepatitis/factsheets_pdf/SIDE_EFFECTS.pdf, (page consultée le 5 décembre 2003), 1-2.
29. Summaries for patients. Duration and dose of antiviral treatment for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 2004; 140:I67.
30. Ascione A, De Luca M, Di Costanzo GG, et al. Incidence of side effects during therapy with different types of alpha interferon: a randomised controlled trial comparing recombinant alpha 2b versus leukocyte interferon in the therapy of naive patients with chronic hepatitis C. *Curr Pharm Des* 2002; 8:977-80.
31. Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, et al. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68:556-67.
32. He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* 1987; 156:636-40.
33. Muratori L, Gibellini D, Lenzi M, et al. Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* 1996; 88:2768-74.
34. Radkowski M, Kubicka J, Kisiel E, et al. Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. *Blood* 2000; 95:3986-9.
35. Sugano M, Hayashi Y, Yoon S, et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1995; 48:820-5.
36. Duvoux C, Pawlotsky JM, Bastie A, Cherqui D, Soussy CJ, Dhumeaux D. Low HCV replication levels in end-stage hepatitis C virus-related liver disease. *J Hepatol* 1999; 31:593-7.
37. Kawamura T, Furusaka A, Koziel MJ, et al. Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology* 1997; 25:1014-21.

38. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, et al. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 2000; 33:106-15.
39. Einav S, Koziel MJ. Immunopathogenesis of hepatitis C virus in the immunosuppressed host. *Transpl Infect Dis* 2002; 4:85-92.
40. Robertson B, Myers G, Howard C, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* 1998; 143:2493-503.
41. Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998; 351:351-5.
42. Pallaoro M, Lahm A, Biasiol G, et al. Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J Virol* 2001; 75:9939-46.
43. Hijikata M, Mizushima H, Tanji Y, et al. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:10773-7.
44. van Doorn LJ. Review: molecular biology of the hepatitis C virus. *J Med Virol* 1994; 43:345-56.
45. Nolte FS. Hepatitis C virus genotyping: clinical implications and methods. *Mol Diagn* 2001; 6:265-77.
46. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000; 132:296-305.
47. Nakano I, Fukuda Y, Katano Y, et al. Interferon responsiveness in patients infected with hepatitis C virus 1b differs depending on viral subtype. *Gut* 2001; 49:263-7.
48. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 1982; 215:1577-85.
49. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:3392-6.
50. Okamoto H, Kojima M, Okada S, et al. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190:894-9.
51. Domingo E, Martinez-Salas E, Sobrino F, et al. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* 1985; 40:1-8.
52. Purcell RH. Hepatitis C and its sequelae: the biology of hepatitis C virus and implications for its control. *Princess Takamatsu Symp* 1995; 25:1-13.
53. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 2000; 20:103-26.
54. University. of Eidelberg, Department of virology molecular, <http://www.molecular-virology.uni-hd.de/EN/hcv.htm>, page consultée le 15 juillet 2004, 2004.
55. Lindenbach BD, Rice CM. Section Two: Specific Virus Families. Chapter 32: Flaviviridae: The Viruses and Their Replication in *Fields Virology*, 4th edition, CD-ROM. Fields B, Knipe D, Howley P, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

56. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:7270-4.
57. Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 2004; 78:1448-55.
58. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:12766-71.
59. Wunschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 2000; 74:10055-62.
60. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, et al. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 2003; 278:41624-30.
61. Hsu M, Zhang J, Flint M, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:7271-6.
62. Takikawa S, Ishii K, Aizaki H, et al. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol* 2000; 74:5066-74.
63. Ando K, Hiroishi K, Kaneko T, et al. Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J Immunol* 1997; 158:5283-91.
64. Pavio N, Lai MM. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 2003; 28:287-304.
65. Pastore G, Monno L, Milella M, et al. Development of antibody to hepatitis C virus (HCV) in acute and chronic non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Eur J Epidemiol* 1992; 8:580-4.
66. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321:1494-500.
67. Farci P, Alter HJ, Wong DC, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7792-6.
68. Farci P, Shimoda A, Wong D, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:15394-9.
69. Korenaga M, Hino K, Katoh Y, et al. A possible role of hypervariable region 1 quasispecies in escape of hepatitis C virus particles from neutralization. *J Viral Hepat* 2001; 8:331-40.
70. Korenaga M, Hino K, Okazaki M, Okuda M, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies between immune complexed and non-immune complexed hepatitis C virus particles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240:677-82.
71. Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, et al. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of

- envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:1759-63.
72. Lamprecht P, Moosig F, Gause A, et al. Immunological and clinical follow up of hepatitis C virus associated cryoglobulinaemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:385-90.
 73. Schmidt WN, Stapleton JT, LaBrecque DR, et al. Hepatitis C virus (HCV) infection and cryoglobulinemia: analysis of whole blood and plasma HCV-RNA concentrations and correlation with liver histology. *Hepatology* 2000; 31:737-44.
 74. Pawlotsky JM. Hepatitis C: virology, clinical aspects and the relation to cryoglobulinemia. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63:200-1.
 75. Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, et al. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 1997; 71:6011-9.
 76. Lamonaca V, Missale G, Urbani S, et al. Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4(+) T cells: implications for vaccine development. *Hepatology* 1999; 30:1088-98.
 77. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117:933-41.
 78. Giuberti T, Marin MG, Ferrari C, et al. Hepatitis C virus viremia following clinical resolution of acute hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 20:666-71.
 79. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191:1499-512.
 80. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Gerlach T, Pape GR. The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C. *J Mol Med* 1996; 74:583-8.
 81. Tabatabai NM, Bian TH, Rice CM, Yoshizawa, Gill J, Eckels DD. Functionally distinct T-cell epitopes within the hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Hum Immunol* 1999; 60:105-15.
 82. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, et al. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346:1006-7.
 83. Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, et al. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104:580-7.
 84. Schupper H, Hayashi P, Scheffel J, et al. Peripheral-blood mononuclear cell responses to recombinant hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1993; 18:1055-60.
 85. Mondelli MU. Is there a role for immune responses in the pathogenesis of hepatitis C? *J Hepatol* 1996; 25:232-8.
 86. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98:706-14.
 87. Cramp ME, Carucci P, Rossol S, et al. Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia. *Gut* 1999; 44:424-9.

88. Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25:449-58.
89. Jacobson Brown PM, Neuman MG. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin Biochem* 2001; 34:167-71.
90. Liaw YF, Lee CS, Tsai SL, et al. T-cell--mediated autologous hepatocytotoxicity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1995; 22:1368-73.
91. Tsai SL, Sheen IS, Chien RN, et al. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: tetramer assay and therapeutic implications. *J Biomed Sci* 2003; 10:120-35.
92. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10:439-49.
93. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, et al. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2003; 197:1645-55.
94. Shoukry NH, Sidney J, Sette A, Walker CM. Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary hepatitis C virus infections. *J Immunol* 2004; 172:483-92.
95. Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, et al. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 2000; 181:1528-36.
96. Koziel MJ, Walker BD. Characteristics of the intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response in chronic hepatitis C virus infection. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 19:69-83.
97. Rehmann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis* 2000; 20:127-41.
98. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, et al. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol* 1993; 67:7522-32.
99. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, et al. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J Clin Invest* 1995; 96:2311-21.
100. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, et al. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 1992; 149:3339-44.
101. Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, et al. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol* 1997; 158:1473-81.
102. Rehmann B, Chang KM, McHutchinson J, et al. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996; 70:7092-102.
103. Gruber A, Lundberg LG, Bjorkholm M. Reactivation of chronic hepatitis C after withdrawal of immunosuppressive therapy. *J Intern Med* 1993; 234:223-5.
104. Bassett SE, Brasky KM, Lanford RE. Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol* 1998; 72:2589-99.

105. Pietschmann T, Bartenschlager R. Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2003; 7:23-43.
106. Lai MM. Hepatitis C virus proteins: direct link to hepatic oxidative stress, steatosis, carcinogenesis and more. *Gastroenterology* 2002; 122:568-71.
107. Galun E, Burakova T, Ketzinel M, et al. Hepatitis C virus viremia in SCID-->BNX mouse chimera. *J Infect Dis* 1995; 172:25-30.
108. Ilan E, Arazi J, Nussbaum O, et al. The hepatitis C virus (HCV)-Trimer mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J Infect Dis* 2002; 185:153-61.
109. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; 7:927-33.
110. Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* 1990; 62:447-56.
111. Beames B, Chavez D, Guerra B, Notvall L, Brasky KM, Lanford RE. Development of a primary tamarin hepatocyte culture system for GB virus-B: a surrogate model for hepatitis C virus. *J Virol* 2000; 74:11764-72.
112. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995; 69:5621-30.
113. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:3401-5.
114. Vassilev VB, Collett MS, Donis RO. Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts. *J Virol* 1997; 71:471-8.
115. Iacovacci S, Sargiacomo M, Parolini I, Ponzetto A, Peschle C, Carloni G. Replication and multiplication of hepatitis C virus genome in human foetal liver cells. *Res Virol* 1993; 144:275-9.
116. Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, et al. Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection. *Arch Virol Suppl* 1993; 8:31-9.
117. Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR. Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* 1994; 202:606-14.
118. Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K. Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol* 1996; 77 (Pt 5):1043-54.
119. Fournier C, Sureau C, Coste J, et al. In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1998; 79 (Pt 10):2367-74.
120. Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, et al. Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 11):3007-18.
121. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Wang TH, Chen DS. Positive and negative strand of hepatitis C virus RNA sequences in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C: no correlation with viral genotypes 1b, 2a, and 2b. *J Med Virol* 1997; 52:270-4.

122. Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, et al. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998; 91:3841-9.
123. Cribier B, Schmitt C, Bingen A, Kim A, Keller F. In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1995; 76 (Pt 10):2485-91.
124. Cribier B, Schmitt C, Kim A, Stoll-Keller F. Inhibition of hepatitis C virus adsorption to peripheral blood mononuclear cells by dextran sulfate. *Arch Virol* 1998; 143:375-9.
125. Lorient MA, Bronowicki JP, Lagorce D, et al. Permissiveness of human biliary epithelial cells to infection by hepatitis C virus. *Hepatology* 1999; 29:1587-95.
126. Germe R, Crance JM, Garin D, Zarski JP, Drouet E. [Hepatitis C virus culture systems]. *Pathol Biol (Paris)* 2001; 49:255-61.
127. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290:1972-4.
128. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285:110-3.
129. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, et al. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002; 76:4008-21.
130. Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 2002; 76:2997-3006.
131. Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001; 75:1252-64.
132. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001; 75:1437-49.
133. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282:103-7.
134. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
135. Dietrich JB. [Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family]. *Arch Physiol Biochem* 1997; 105:125-35.
136. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2239-44.
137. Galle PR. Apoptosis in liver disease. *J Hepatol* 1997; 27:405-12.
138. Bursch W, Taper HS, Lauer B, Schulte-Hermann R. Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1985; 50:153-66.
139. Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. Preferential distribution of apoptotic bodies in acinar zone 3 of normal human and rat liver. *J Hepatol* 1988; 7:319-24.
140. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995; 182:1223-30.

141. Patel T, Bronk SF, Gores GJ. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994; 94:2183-92.
142. Muller M, Strand S, Hug H, et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997; 99:403-13.
143. Krams SM, Egawa H, Quinn MB, Villanueva JC, Garcia-Kennedy R, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59:621-5.
144. Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13:245-51.
145. Bantel H, Schulze-Osthoff K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 2003; 10 Suppl 1:S48-58.
146. Hengartner MO, Horvitz HR. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4:581-6.
147. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75:641-52.
148. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90:405-13.
149. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10:1-15.
150. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87:171.
151. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:269-90.
152. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383-424.
153. Fesik SW, Shi Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science* 2001; 294:1477-8.
154. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91:443-6.
155. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281:1312-6.
156. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; 144:281-92.
157. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 1994; 78:343-52.
158. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 1994; 370:270-5.
159. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391:43-50.

160. Liu X, Li P, Widlak P, et al. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:8461-6.
161. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89:175-84.
162. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 2003; 17:2481-95.
163. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226:1097-9.
164. Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; 144:3602-10.
165. Nunez G, Clarke MF. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* 1994; 4:399-403.
166. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-6.
167. Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 1993; 268:25265-8.
168. Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1994; 54:2468-71.
169. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; 369:321-3.
170. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, et al. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374:733-6.
171. Zha H, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 1996; 271:7440-4.
172. Simonen M, Keller H, Heim J. The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur J Biochem* 1997; 249:85-91.
173. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74:609-19.
174. Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1994; 79:189-92.
175. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:7834-8.
176. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 2000; 466:6-10.
177. Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* 2001; 292:624-6.

178. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281:1305-8.
179. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271:4961-5.
180. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85:817-27.
181. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998; 17:1675-87.
182. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94:491-501.
183. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996; 184:1331-41.
184. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 1997; 186:25-37.
185. Whitton JL, Oldstone MBA. section 1, General Virology. Chapter 11, The Immune Response to Viruses in *Fields Virology*, 4th edition, CD-ROM. Fields B, Knipe D, Howley P: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001.
186. Joly E, Mucke L, Oldstone MB. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* 1991; 253:1283-5.
187. Joly E, Oldstone MB. Neuronal cells are deficient in loading peptides onto MHC class I molecules. *Neuron* 1992; 8:1185-90.
188. Rall GF. CNS neurons: the basis and benefits of low class I major histocompatibility complex expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 232:115-34.
189. Oldstone MBA, Buchmeier MJ. Restricted expression of viral glycoprotein in cells of persistently infected mice. *nature* 1982; 350:360-362.
190. Borrow P, Lewicki H, Wei X, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997; 3:205-11.
191. Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 1991; 354:453-9.
192. Lewicki HA, Von Herrath MG, Evans CF, Whitton JL, Oldstone MB. CTL escape viral variants. II. Biologic activity in vivo. *Virology* 1995; 211:443-50.
193. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:3468-72.
194. Kumar U, Monjardino J, Thomas HC. Hypervariable region of hepatitis C virus envelope glycoprotein (E2/NS1) in an agammaglobulinemic patient. *Gastroenterology* 1994; 106:1072-5.
195. Booth JC, Kumar U, Webster D, Monjardino J, Thomas HC. Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of

- hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology* 1998; 27:223-7.
196. Farci P, Shimoda A, Coiana A, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288:339-44.
 197. Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, et al. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:2755-9.
 198. Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, et al. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001; 15:883-95.
 199. Tsai SL, Chen YM, Chen MH, et al. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998; 115:954-65.
 200. Cucchiaroni M, Kammer AR, Grabscheid B, et al. Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cell Immunol* 2000; 203:111-23.
 201. He XS, Rehmann B, Lopez-Labrador FX, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:5692-7.
 202. King CC, Jamieson BD, Reddy K, Bali N, Concepcion RJ, Ahmed R. Viral infection of the thymus. *J Virol* 1992; 66:3155-60.
 203. Patterson S, Knight SC. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1987; 68 (Pt 4):1177-81.
 204. Weissman D, Fauci AS. Role of dendritic cells in immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:358-67.
 205. Borrow P, Evans CF, Oldstone MB. Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. *J Virol* 1995; 69:1059-70.
 206. Zinkernagel RM. Virus-induced acquired immune suppression by cytotoxic T cell-mediated immunopathology. *Vet Microbiol* 1992; 33:13-8.
 207. Miller DM, Sedmak DD. Viral effects on antigen processing. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:94-9.
 208. Johnson DC, Hill AB. Herpesvirus evasion of the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 232:149-77.
 209. Spriggs MK, Armitage RJ, Comeau MR, et al. The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation. *J Virol* 1996; 70:5557-63.
 210. Comeau MR, Johnson R, DuBose RF, et al. A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 1998; 8:473-82.
 211. Spriggs MK. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:101-30.
 212. Spriggs MK, Hruby DE, Maliszewski CR, et al. Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell* 1992; 71:145-52.

213. Mena I, Perry CM, Harkins S, Rodriguez F, Gebhard J, Whitton JL. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol* 1999; 155:1205-15.
214. Planz O, Seiler P, Hengartner H, Zinkernagel RM. Specific cytotoxic T cells eliminate B cells producing virus-neutralizing antibodies [corrected]. *Nature* 1996; 382:726-9.
215. Pozzato G, Mazzaro C, Crovatto M, et al. Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection, and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1994; 84:3047-53.
216. Ferri C, Caracciolo F, Zignego AL, et al. Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1994; 88:392-4.
217. Zuckerman E, Zuckerman T, Levine AM, et al. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med* 1997; 127:423-8.
218. Wack A, Soldaini E, Tseng C, Nuti S, Klimpel G, Abrignani S. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:166-75.
219. Crotta S, Stilla A, Wack A, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002; 195:35-41.
220. Kanto T, Hayashi N, Takehara T, et al. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999; 162:5584-91.
221. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001; 120:512-24.
222. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001; 97:3171-6.
223. Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:8479-83.
224. White E, Sabbatini P, Debbas M, Wold WS, Kusher DI, Gooding LR. The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 1992; 12:2570-80.
225. Ludlow JW. Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53. *Faseb J* 1993; 7:866-71.
226. Tevethia MJ, Lacko HA, Kierstead TD, Thompson DL. Adding an Rb-binding site to an N-terminally truncated simian virus 40 T antigen restores growth to high cell density, and the T common region in trans provides anchorage-independent growth and rapid growth in low serum concentrations. *J Virol* 1997; 71:1888-96.
227. Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, et al. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:1172-6.
228. Delhem N, Sabile A, Gajardo R, et al. Activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by hepatocellular carcinoma derived-hepatitis C virus core protein. *Oncogene* 2001; 20:5836-45.

229. Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002; 296:84-93.
230. Takamatsu M, Fujita T, Hotta H. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Kobe J Med Sci* 2001; 47:97-112.
231. Soguero C, Joo M, Chianese-Bullock KA, Nguyen DT, Tung K, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein leads to immune suppression and liver damage in a transgenic murine model. *J Virol* 2002; 76:9345-54.
232. Honda A, Hatano M, Kohara M, et al. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol* 2000; 33:440-7.
233. Ray RB, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996; 226:176-82.
234. Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* 1999; 73:4713-20.
235. Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998; 273:2256-9.
236. Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000; 276:127-37.
237. Honda M, Kaneko S, Shimazaki T, et al. Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology* 2000; 31:1351-9.
238. Lasarte JJ, Sarobe P, Boya P, et al. A recombinant adenovirus encoding hepatitis C virus core and E1 proteins protects mice against cytokine-induced liver damage. *Hepatology* 2003; 37:461-70.
239. Dumoulin FL, van den Bussche A, Sohne J, Sauerbruch T, Spengler U. Hepatitis C virus core protein does not inhibit apoptosis in human hepatoma cells. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:940-6.
240. Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Lim SG, Tan YH, Hong WJ. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 2001; 290:224-36.
241. Ruggieri A, Harada T, Matsuura Y, Miyamura T. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1997; 229:68-76.
242. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, et al. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998; 72:3691-7.
243. Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, et al. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 2002; 196:641-53.
244. Zhu N, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology* 2001; 283:178-87.
245. Erdtmann L, Franck N, Lerat H, et al. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278:18256-64.

246. Fujita T, Ishido S, Muramatsu S, Itoh M, Hotta H. Suppression of actinomycin D-induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229:825-31.
247. Majumder M, Ghosh AK, Steele R, et al. Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology* 2002; 294:94-105.
248. Gale M, Jr., Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999; 73:6506-16.
249. Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, et al. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:4801-11.
250. Sun J, Bodola F, Fan X, et al. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 2001; 75:11992-8.
251. Taya N, Torimoto Y, Shindo M, Hirai K, Hasebe C, Kohgo Y. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. *Br J Haematol* 2000; 110:89-97.
252. Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Bilodeau M. Role of EGF receptor tyrosine kinase activity in antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G1360-9.
253. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48:4827-33.
254. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
255. Wertz IE, Dixit VM. Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2000; 275:11470-7.
256. Deng X, Kornblau SM, Ruvolo PP, May WS, Jr. Regulation of Bcl2 phosphorylation and potential significance for leukemic cell chemoresistance. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001:30-7.
257. Mori M, Uchida M, Watanabe T, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol* 2003; 195:290-7.
258. Sui X, Krantz SB, Zhao ZJ. Stem cell factor and erythropoietin inhibit apoptosis of human erythroid progenitor cells through different signalling pathways. *Br J Haematol* 2000; 110:63-70.
259. Schwarz CS, Seyfried J, Evert BO, Klockgether T, Wullner U. Bcl-2 up-regulates ha-ras mRNA expression and induces c-Jun phosphorylation at Ser73 via an ERK-dependent pathway in PC 12 cells. *Neuroreport* 2002; 13:2439-42.
260. Suzuki J, Kaziro Y, Koide H. Synergistic action of R-Ras and IGF-1 on Bcl-xL expression and caspase-3 inhibition in BaF3 cells: R-Ras and IGF-1 control distinct anti-apoptotic kinase pathways. *FEBS Lett* 1998; 437:112-6.
261. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* 2003; 22:469-80.

262. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:7686-9.
263. Bantel H, Luger A, Poremba C, et al. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; 34:758-67.
264. Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* 2001; 22:31-4.
265. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1453-8.
266. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:727-33.
267. Watanabe J, Kushihata F, Honda K, Mominoki K, Matsuda S, Kobayashi N. Bcl-xL overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 21:515-9.
268. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologie Moléculaire de la cellule*. In: *Médecine-Sciences*, ed. Paris: Flammarion, 1995:1408, 896-897.
269. Barnes B, Lubyova B, Pitha PM. On the role of IRF in host defense. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22:59-71.
270. Sakuma H, Yamamoto M, Okumura M, Kojima T, Maruyama T, Yasuda K. High glucose inhibits apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells by increasing bcl-xL and bfl-1/A1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C422-8.
271. Coll ML, Rosen K, Ladeda V, Filmus J. Increased Bcl-xL expression mediates v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21:2908-13.
272. Inglesby TV, Rai R, Astemborski J, et al. A prospective, community-based evaluation of liver enzymes in individuals with hepatitis C after drug use. *Hepatology* 1999; 29:590-6.
273. Alter HJ, Conry-Cantilena C, Melpolder J, et al. Hepatitis C in asymptomatic blood donors. *Hepatology* 1997; 26:29S-33S.
274. Mathurin P, Moussalli J, Cadranet JF, et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1998; 27:868-72.



1961-1962