

Université de Montréal

Étude des autoanticorps marqueurs de l'hépatite autoimmune présents
chez les patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C

Par
Kathie Béland

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de maîtrise en Science Biomédicales

Décembre 2004

©Kathie Béland, 2004



W

4

U58

2005

V. 117

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 :

Étude des autoanticorps marqueurs de l'hépatite autoimmune présents chez
les patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C

Présenté par :
Kathie Béland

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Carolina Alfieri
Président-rapporteur

Dr Fernando Alvarez
Directeur de recherche

Dr Marc Bilodeau
Membre du jury

Résumé

Introduction : La présence d'autoanticorps circulants a été rapportée chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C (VHC). Des autoanticorps anti-LKM1, marqueurs spécifiques de l'hépatite autoimmune (HAI), sont retrouvés chez 10% de ces patients.

But : Déterminer la présence d'autres autoanticorps marqueurs de l'HAI tel que les anti-LC1 et/ou anti-SLA/LP chez les patients VHC+ et les caractériser.

Méthodes : Des patients VHC+ ont été testés afin de détecter la présence d'autoanticorps anti-LC1 et/ou anti-SLA/LP dans leur sérum par immunobuvardage, immunoprécipitation, ELISA et « phage display ».

Résultats : 12% des patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C ont des autoanticorps anti-LC1 et 10% ont des anti-SLA. En présence d'anti-LKM1 la prévalence des anti-LC1 demeure la même mais celle des anti-SLA est plus élevée, soit 27%. Les épitopes reconnus par ces deux autoanticorps sont majoritairement conformationnels et répartis sur l'ensemble de leur antigène. 33% des patients LC1+ réagissent contre l'autoantigène dénaturé en immunobuvardage, une proportion similaire à celle trouvée pour les anti-LKM1 chez les patients infectés par le VHC. Trois épitopes conformationnels potentiels reconnus par les anti-LC1 ont été identifiés par « phage display ». Les autoanticorps anti-SLA sont de sous-classe IgG1 et IgG4.

Conclusions : La présence d'autoanticorps anti-LC1 et d'anti-SLA/LP est aussi fréquente que celle des autoanticorps anti-LKM1 chez les patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C. Les anti-LC1 et anti-SLA/LP peuvent être considérés comme marqueurs d'autoimmunité dans l'infection chronique par le virus de l'hépatite C.

Mots clés : Hépatite autoimmune, virus de l'hépatite C, autoanticorps, formiminotransférase cyclodésaminase, autoanticorps anti-LC1, autoanticorps anti-SLA/LP, tRNP^(ser/sec).

Abstract

Background: Several autoantibodies have been reported in patients chronically infected by the hepatitis C virus (HCV). 10% of these patients present anti-liver-kidney microsome type 1 (anti-LKM1) autoantibodies. In type 2 autoimmune hepatitis, anti-LKM1 autoantibodies are frequently associated with anti-liver-cytosol type 1 (anti-LC1) and/or anti-SLA/LP autoantibodies.

Aims: To determine the prevalence of anti-LC1 and anti-SLA/LP autoantibodies in a hepatitis C-positive population, and characterize their reactivity.

Methods: Patients chronically infected by hepatitis C virus were tested by western blotting, immunoprecipitation, ELISA and phage display to detect and characterize the autoantibodies.

Results: 12% of this hepatitis C population shows anti-LC1 and 10% shows anti-SLA/LP autoantibodies. The prevalence of anti-SLA/LP is higher in presence of anti-LKM1 (27%), which is not the case for anti-LC1. Epitopes were found throughout the specific antigens for both autoantibodies. 33% of HCV+/LC1+ recognized the denatured antigen when tested by western blot, which is similar to what was found for anti-LKM1 in HCV infection. Three putative conformational epitopes were identified for anti-LC1 by phage display. Anti-SLA/LP were IgG1 and IgG4.

Conclusions: Anti-LC1 and anti-SLA/LP autoantibodies are as prevalent as anti-LKM1 autoantibodies in patients infected with hepatitis C virus. Autoantibody reactivity against the anti-LC1 antigen is different in hepatitis C than in type 2 autoimmune hepatitis. Anti-LC1 and anti-SLA/LP autoantibodies can now be regarded as a serological marker of autoimmunity in chronic hepatitis C infection.

Key words: autoimmune hepatitis, hepatitis C virus, autoantibodies, formiminotransferase cyclodeaminase, anti-LC1 autoantibodies, anti-SLA/LP, tRNP^(scr/sec).

Table des Matières

<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	<i>vi</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>vi</i>
<i>LISTE DES ABRÉVIATIONS</i>	<i>vii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>ix</i>
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
L'immunité innée	1
L'immunité acquise	3
La tolérance	6
Génération du répertoire des cellules T et B	6
Tolérance centrale	7
Tolérance périphérique	8
Autoimmunité	10
Définition et classification	10
Étiologie	14
Hépatite autoimmune	23
Historique	23
Définition	24
Génétique	30
Pathophysiologie	33
Autoanticorps et Autoantigènes	35
Le virus de l'hépatite C	38
VHC et autoimmunité	40
<i>Article I: Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection</i>	<i>43</i>
<i>Article II: Anti-Soluble Antigen (SLA) Antibodies in Chronic HCV Infection</i>	<i>50</i>
<i>Discussion</i>	<i>56</i>
Détermination de la prévalence	57
Réactivité des autoanticorps	59
Lien entre les autoanticorps	61
Isotypage	63
Cartographie des épitopes	64
Épitopes inéaires	64
Épitopes conformationnels	65
<i>Conclusions</i>	<i>68</i>
<i>Références</i>	<i>70</i>

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I. Exemples de maladies autoimmunes organe-spécifiques ou systémiques ainsi que leurs autoantigènes ciblés et le mécanisme de destruction associé.	<u>13</u>
TABLEAU II. Exemples de quelques maladies autoimmunes pour lesquelles le mimétisme moléculaire est proposé comme facteur déclencheur et modèle animal reproduisant ce mécanisme.	<u>20</u>
TABLEAU III : Grille de score pour le diagnostic de l'hépatite autoimmune.	<u>26</u>
TABLEAU IV: Autoanticorps retrouvés chez les enfants atteints de l'hépatite autoimmune.	<u>28</u>

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Mécanismes de tolérance centrale et périphérique.	<u>9</u>
FIGURE 2 : Distribution selon le sexe et prévalence des principales maladies autoimmunes.	<u>15</u>
FIGURE 3. Résumé des principaux facteurs menant à une réponse autoimmune.	<u>21</u>
FIGURE 4 : Exemple d'inflammation hépatique dans l'hépatite autoimmune.	<u>29</u>
FIGURE 5 : Mécanismes de présentation d'un autoantigène à une cellule CD4 naïve par la molécule HLA DR.	<u>31</u>
FIGURE 6: L'attaque autoimmune du foie.	<u>33</u>
FIGURE 7 : Schéma de la structure octamérique de la formiminotransférase cyclodésaminase.	<u>36</u>
FIGURE 8 : Organisation du génome et de la polyprotéine du virus de l'hépatite C.	<u>39</u>
FIGURE 9 : Progression de l'infection par le virus de l'hépatite C selon les individus.	<u>40</u>
FIGURE 10 : Association entre les divers autoanticorps spécifiques de l'hépatite autoimmune dans l'infection chronique par le virus de l'hépatite C.	<u>62</u>
FIGURE 11 : Schéma récapitulatif des épitopes des anti-LC1 chez les patients atteints de l'hépatite autoimmune de type II ou infectés par le virus de l'hépatite C.	<u>65</u>

LISTE DES ABRÉVIATIONS

NK	« Natural Killer » (tueuse naturelle)
IFN- γ	Interféron gamma
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
Ig	Immunoglobuline
TCR	« T-cell receptor » (Récepteur des cellules T)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
TNF- α	« Tumor necrosis factor- α » (Facteur de nécrose tumoral)
CTLA-4	« Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 » (Antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique)
FasL	Fas ligand
LPS	Lipopolysaccharides
VHC	Virus de l'hépatite C
HAI	Hépatite autoimmune
ACTH	Hormone adénocorticotropique
SMA	« Smooth-muscle antibodies » (Anti-muscle lisse)
ANA	« Anti-nuclear antibodies » (Anti-noyau)
Anti-LKM1	« Anti-liver kidney microsome 1 » (anti-microsomes de foie et de rein)
Anti-LC1	Anti-cytosol de foie I
Anti-SLA/LP	« Anti-soluble liver protein » (anti-protéine soluble du foie)
Anti-ASGP-R	Anti-récepteur de l'asiaglycoprotéine
FTCD	Formiminotransférase cyclodéaminase
tRNP ^(ser/sec)	Ribonucléoprotéine associée à l'ARNt suppresseur de l'UGA
NS	Non-structurelle
aa	Acide aminé

*« Si j'ai pu voir plus loin que les autres
c'est que je me suis tenu sur les épaules des géants »*

Isaac Newton
(1642-1727)

Remerciements

Je voudrais remercier premièrement mon directeur de recherche et mon mentor, le Dr Fernando Alvarez. Il m'a enseigné la pensée et la rigueur scientifiques en plus de m'avoir guidée tout au long de ma maîtrise par ses sages conseils et son expérience.

Merci au Centre de Recherche, à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, la Fondation Canadienne des Maladies du Foie, aux Cinémas Guzzo, à la Falk Foundation et à Dr Alvarez pour leur soutien financier.

Merci à tous mes collègues de laboratoire, Pascal Lapierre, Gabriel Marceau, Dr Idriss Djilali-Saiah, Susana Vitozzi, Réginald Renous, Amin Fakhfakh, Chantal Piché, Myriam Troesch, Alexis-Simon Cloutier, Dr Denise Herzog, Dr Steven Martin et Sylvie Marineau. Un merci particulier à Pascal Lapierre pour son soutien, son expérience, ses idées et son enseignement des techniques et des adages de la recherche en sciences. Merci aussi à Gabriel Marceau avec qui on a fait un bon trio! Merci à tous pour l'atmosphère particulièrement agréable du laboratoire, l'entraide générale et les nombreuses discussions stimulantes. Ceci a favorisé l'apprentissage et a rendu agréable mes années passées au sein de cette équipe.

Finalement, merci à ma famille qui m'ont toujours supportée et qui ont toujours cru en moi. Je ne me serais pas rendue si loin sans vous.

Merci!

Introduction

Le système immunitaire nous protège contre les divers envahisseurs qui font partie de notre environnement quotidien. Les multiples acteurs de ce système complexe agissent en synergie afin de générer une protection efficace et ciblée. Il est important que le système immunitaire différencie le soi du non soi. En effet, le système immunitaire peut entraîner des dommages plus ou moins importants aux constituants du soi, des réactions qualifiées comme autoimmunes. Ces réactions peuvent se manifester sous forme de diverses maladies autoimmunes ou encore, n'avoir que très peu de conséquences. Le mémoire qui suit vise à étudier ces réactions aberrantes dans un contexte d'une maladie autoimmune, soit l'hépatite autoimmune, et dans un contexte viral, soit l'apparition d'autoanticorps chez les patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C. Mais tout d'abord révisons les bases du fonctionnement normal du système immunitaire et ensuite, nous élaborerons sur l'autoimmunité proprement dite.

L'immunité innée

Le système immunitaire dit « inné » constitue la protection en place dès la naissance. Ses effecteurs sont non spécifiques, c'est-à-dire qu'ils réagissent à des constituants du non soi communs à plusieurs microorganismes. Le système inné est la première barrière qu'un envahisseur rencontrera. En effet, ses premiers constituants sont la peau et les muqueuses. Les liens étroits entre les cellules qui en font partie forment une barrière étanche à l'entrée des pathogènes. De plus, le mucus qui se retrouve à leur surface contient des agents antimicrobiens tel qu'un pH acide, des antifongiques et des agents antibactériens.

Toutefois, si cette barrière est endommagée, ou si l'envahisseur réussit à pénétrer dans l'organisme par un autre moyen, il fera face à une panoplie d'autres intervenants de première ligne tel que les macrophages, les neutrophiles, le complément et les cytokines. En effet, lorsque le microorganisme envahit les tissus, il rencontre des macrophages qui

y sont établis. Lors de la rencontre du microorganisme, le macrophage s'active via des récepteurs qui reconnaissent des constituants propres à l'agent infectieux, tels que les lipopolysaccharides (LPS), via les récepteurs « toll-like » situés sur sa membrane. Par ce fait, il entame la phagocytose de l'intrus tout en sécrétant des cytokines. Ces dernières ont un rôle chimiotactique qui permet la mise en place de la réaction d'inflammation et le recrutement d'autres cellules tels que les neutrophiles. Si le microorganisme se retrouve en circulation ou dans les espaces intertissulaires, il sera identifié par le système du complément. Ce dernier consiste en une cascade de réaction de protéines plasmatiques déclenchée par la présence d'un anticorps sur la membrane (dans un contexte d'immunité acquise) ou par divers constituants bactériens. Cette cascade de réaction mènera à l'opsonisation ou à la lyse du microorganisme par la formation de pores dans sa membrane. De plus, le complément a un effet chimiotactique, ayant pour conséquence de recruter d'autres cellules immunitaires au site d'infection.

Toutefois, ces défenses sont peu ou pas efficaces dans le cas d'une infection par un virus. Dans ce cas, ce sont les cellules « natural killer » (ou cellules NK) qui prennent la relève. Ces cellules ont la particularité de reconnaître des constituants du soi qui sont altérés. Elles possèdent à leur surface des récepteurs d'activation et des récepteurs d'inhibition spécifiques pour les récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Donc, une expression altérée des constituants membranaires d'une cellule active la cellule NK qui réagit en déclenchant l'apoptose des cellules infectées. D'autres part, lors d'une infection intracellulaire, les cellules infectées sécrètent de l'interféron gamma (IFN- γ) ce qui active les cellules NK et signale aux cellules avoisinantes la présence d'un intrus. Suivant ce signal, les cellules sont davantage en mesure de prévenir la réplication du virus et donc sa propagation.

En somme, les constituants du système immunitaire inné sont aptes à reconnaître et à éliminer les pathogènes via de multiples mécanismes. Au bout de 4 à 7 jours, une réponse immunitaire dite acquise se développera afin d'éliminer totalement l'envahisseur, et ce d'une façon spécifique. Ainsi le corps se prémunit contre une réinfection via la génération d'une mémoire immunitaire (1, 2).

L'immunité acquise

L'immunité dite acquise est plus spécifique et entraîne le développement d'une réponse particulière à chaque infection qui se termine par l'établissement d'une mémoire. L'immunité acquise est composée de trois acteurs principaux soit les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les cellules T et les cellules B. Ces cellules interagissent afin de développer une réponse précise et de grande affinité contre l'envahisseur.

Les CPA sont des cellules qui font le pont entre le système inné et acquis. En effet, ces cellules présentent en permanence divers antigènes, du soi ou du non soi, qu'elles ingèrent par phagocytose ou pinocytose. En plus de présenter ces antigènes aux cellules T, les CPA ont des co-récepteurs activateurs ou inhibiteurs à leur surface et sécrètent des cytokines afin de moduler la réponse immunitaire.

Les cellules B sont en partie responsables de l'immunité humorale. En effet, lorsque ces cellules sont activées par les CPA et les cellules T, elles se différencient en plasmocytes et sécrètent des anticorps solubles. De plus, les lymphocytes B ont aussi la capacité d'être activés par la liaison d'un antigène spécifique aux récepteurs exprimés à leur surface. De cette façon, les lymphocytes B protègent contre les infections dans l'espace extracellulaire et les muqueuses.

Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire. Ils sont caractérisés par l'expression à leur surface d'un récepteur T (TCR) spécifique à l'antigène. Deux populations de cellules T sont reconnues selon le co-récepteur présent à leur surface, soit CD4 ou CD8. Les cellules T CD4+ s'activent lorsqu'elles rencontrent un peptide antigénique spécifique à leur TCR présenté par une molécule CMH de type II. Ces dernières sont exprimées par la majorité des cellules du système immunitaire. Une fois stimulés, les lymphocytes T CD4+ participeront à l'activation des lymphocytes B et T, et sécréteront diverses cytokines pro-inflammatoires qui seront responsables d'une réponse efficace. Pour leur part, les CD8+ reconnaissent les peptides présentés par le

CMH de type I à la surface de toutes les cellules de l'organisme. Lorsque les lymphocytes T CD8⁺ sont activés, ils ont un effet cytotoxique et engendrent l'apoptose des cellules infectées.

Puisque ces réponses sont spécifiques à chaque microorganisme, le système immunitaire doit être apte à reconnaître plusieurs antigènes de chaque agent infectieux, ce qui requiert une grande diversité de récepteurs. Comme nous le verrons plus en détail ultérieurement, cette diversité de récepteurs est obtenue par un phénomène aléatoire de recombinaison. Ces recombinaisons permettent la formation de plus de 1×10^{11} récepteurs différents dont certains reconnaissent des constituants du soi (1). L'organisme doit donc se prévaloir d'un système de surveillance afin que le système immunitaire acquis demeure toujours tolérant au soi.

CD4+: la balance Th1 et Th2

Le type de réponse cellulaire acquise est déterminée et régulée par les cellules T CD4⁺, aussi appelées cellules T auxiliaires (Th). Lors de la réponse immunitaire, les cellules T CD4⁺ auxiliaires vont entrer en contact avec les cellules T CD8⁺ et les lymphocytes B qui ont une spécificité pour le même antigène et vont fournir un signal de co-stimulation afin que ces dernières s'activent et prolifèrent. Au même moment, ces Th vont sécréter diverses cytokines afin de diriger la réponse de façon appropriée au pathogène présent.

En effet, en fonction du type d'insulte et grâce aux CPA, les cellules Th spécifiques vont développer un ou l'autre des phénotypes suivant : Th1 ou Th2. Selon ce phénotype, les cellules CD4⁺ sécréteront des cytokines différentes ce qui aura pour effet de stimuler des réponses distinctes. Par exemple, s'il survient une infection virale les Th0 deviendront des Th1 et sécréteront de l'interleukine-2, de l'interféron- γ et du TNF- α (« tumor necrosis factor- α »). De ce fait, elles co-stimuleront des cellules T cytotoxiques (CD8⁺) qui s'activeront et se multiplieront afin d'enrayer l'infection. De plus, ces cytokines activeront les macrophages et les cellules NK, ce qui facilitera la réponse cellulaire. D'autre part, si le pathogène est un parasite, les Th0 se transformeront en Th2 et sécréteront principalement de l'interleukine-4, de l'interleukine-5, de l'interleukine-10

et de l'interleukine-13. Ceux-ci favoriseront une réponse humorale contre le parasite. Lorsqu'un type de réponse est choisi, les cytokines sécrétées par les cellules auxiliaires auront pour effet d'inhiber l'autre réponse et vice-versa, donc une réponse Th1 inhibera la réponse Th2 et une Th2 inhibera la Th1.

Toutefois, il n'existe pas de cellules purement Th1 ou Th2 mais il s'agit d'une balance entre les deux. Cette balance est importante pour les réponses immunitaires contre des agents infectieux, dans la réponse autoimmune et dans la grossesse. De plus, elle dirige le changement d'isotypes et de sous-classes dans la réponse B. (3)

La réponse humorale : isotypes et sous-classes

Lorsqu'un lymphocyte B entre en contact avec son antigène, il nécessite une co-stimulation d'une cellule CD4⁺ auxiliaire afin de s'activer et se différencier en plasmocytes. Le premier type d'anticorps que le plasmocyte sécrètera sera de l'immunoglobuline (Ig) M qui forment la première ligne de défense humorale. Suite à cette première défense, la réponse immune s'affinera afin d'être plus spécifique au type d'insulte présente. En effet, le lymphocyte B subira un changement d'isotype selon le type de cytokines relâchées par la cellule Th co-activatrice.

Il existe cinq isotypes possibles soit les IgM, les IgG, les IgA, les IgE et les IgD. Ces isotypes ont tous des caractéristiques et des rôles biologiques différents. Par exemple, les IgM sont sécrétés dans la réponse primaire à l'antigène, ont une courte demi-vie et ont une grande capacité d'activation du complément. Les IgG sont les plus fréquents, ont la plus longue demi-vie et facilitent l'opsonisation des bactéries. Ils sont abondants dans le sérum et sont les seuls à pouvoir traverser la barrière placentaire. Les IgG sont sous-divisés en sous-classes, IgG1 à 4, en raison de leur abondance dans le sérum et de leurs différences structurelles qui sont reflétées dans leurs caractéristiques biologiques. La production d'une sous-classe est dépendante de la sécrétion de cytokines par les CD4⁺ auxiliaires. Ainsi, les IgG1 et les IgG3 sont produites lors d'une réponse Th1, et ont une forte capacité d'activation du complément et de liaison aux macrophages. D'autre part, toutes les sous-classes d'IgG sont retrouvées lors d'une réponse Th2.(1, 2)

En ce qui concerne les IgA, elles sont relâchées lors d'une infection virale et sont retrouvées entre autres dans les muqueuses et les sécrétions telles que les larmes, la salive, la sueur et les fluides gastriques. Elles sont elles aussi divisées en deux sous-classes selon leur structure et fonction : les IgA1 et les IgA2. Les IgE, pour leur part, sont sécrétées lors des réactions contre les parasites et sont les principaux effecteurs des réactions allergiques. Finalement, les IgD sont différentes des autres en ce qu'elles ne sont pas sécrétées par les plasmocytes. En effet, ces immunoglobulines restent encrées dans la membrane des lymphocytes B et servent de récepteurs. Ces dernières seraient impliquées dans le développement de la tolérance par les lymphocytes B.

La tolérance

Les cellules T et B proviennent toutes deux des cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse et dans le foie chez le fœtus. Lors de la maturation, les cellules T migreront vers le thymus alors que les cellules B demeureront dans la moelle. C'est à ces endroits que ces cellules seront soumises au premier point de contrôle, soit la tolérance dite centrale.

Génération du répertoire des cellules T et B

Tout d'abord, il est important de revoir les mécanismes complexes mis en place pour la génération de récepteurs diversifiés des cellules T et B. Les gènes codant pour les récepteurs de ces cellules sont composés de différentes régions, qui sont soumises à de la recombinaison somatique, de l'épissage, de l'insertion d'ADN et d'hypermutations somatiques permises aux régions de réassemblage, le tout de manière aléatoire. Tous ces mécanismes sont en place afin de générer une diversité de récepteurs, soit les immunoglobulines (Ig) pour les cellules B ou les TCR, qui outilleront le système immunitaire à discriminer et à réagir contre tout envahisseur possible (1).

Tolérance centrale

La tolérance centrale a lieu lors de la maturation des cellules immunitaires, dans la moelle osseuse pour les cellule B ou dans le thymus pour les cellules T. La maturation des lymphocytes implique une sélection négative et positive des cellules avant que ces dernières ne gagnent la circulation.

Les lymphocytes immatures doivent traverser une matrice cellulaire prodiguant divers signaux qui les guideront tout au long de leur maturation. Si le lymphocyte n'exprime pas un IgM fonctionnel dans le cas des lymphocytes B ou, s'il ne reconnaît pas le CMH dans le cas d'un lymphocyte T, il sera éliminé. Ce processus est appelé la sélection positive. Par ailleurs, le lymphocyte aura à faire face à de multiples antigènes du soi auxquels il ne devra pas réagir. Ces antigènes consistent en peptides de diverses protéines, organe-spécifiques ou non, exprimées dans le thymus (ou les cellules de la moelle osseuse) à des fins de tolérance. Si un lymphocyte réagit trop fortement à un antigène du soi, il sera éliminé par un phénomène de délétion clonale (1, 2). Ce processus appelé sélection négative vise à assurer la tolérance au soi.

Toutefois, les récepteurs des lymphocytes sont aptes à reconnaître plus d'une séquence protéique. En effet, grâce à cette plasticité, une cellule peut réagir faiblement à un épitope du soi et plus fortement à une protéine d'un microorganisme (1, 4, 5). Face à ce dilemme, le système immunitaire doit choisir entre le compromis de limiter sa diversité de récepteurs et ainsi être plus vulnérable aux infections ou avoir une plus grande diversité et risquer le développement d'une autoréactivité. Ce problème est réglé par la mise en place d'un deuxième système qui complétera le premier, celui de la tolérance périphérique (4). (voir FIGURE 1)

Tolérance périphérique

Les organes de maturation des lymphocytes n'expriment pas toutes les protéines du corps laissant ainsi évader des clones autoréactifs ou faiblement réactifs contre le soi. Ces lymphocytes gagnent la circulation et seront soumis à un autre système de contrôle agissant via multiples mécanismes soit l'ignorance, l'anergie, le changement de phénotype, l'apoptose, les cellules dendritiques tolérogènes et les cellules T régulatrices (4, 6, 7).

Le phénomène d'ignorance se produit lorsqu'un lymphocyte autoréactif n'est que peu ou pas du tout en contact avec son autoantigène. C'est le cas entre autres dans des compartiments dits immunoprivilégiés tel que les testicules, l'œil ou le système nerveux central où les lymphocytes ont un accès très limité. L'ignorance peut survenir aussi lorsque la quantité d'antigène n'est pas assez élevée pour activer la cellule autoréactive.

L'anergie consiste en un manque de co-stimulation lorsque le lymphocyte rencontre son antigène. En effet, afin qu'un lymphocyte s'active il nécessite une co-stimulation, normalement donnée par une CPA. Cette inactivation peut être induite aussi par une co-stimulation négative via la liaison d'une protéine inhibitrice tel que la « cytotoxique T-lymphocyte-associated antigen 4 » (CTLA-4).

Le changement de phénotype est observé lorsqu'un lymphocyte autoréactif est activé. Ce dernier sera contrôlé via une déviation vers un phénotype non pathogène par l'action des cytokines (une réponse Th1 vers une Th2) ou encore une impossibilité de migrer dans les tissus lymphoïdes secondaires tel que les ganglions ou la rate. À ce moment, une réponse efficace ne pourra pas être développée et une tolérance sera établie. De plus, la mort par apoptose peut être induite lorsqu'un TCR lie trop fortement son antigène. La cellule entrera en apoptose, entre autre via la sécrétion autocrine de Fas ligand (FasL).

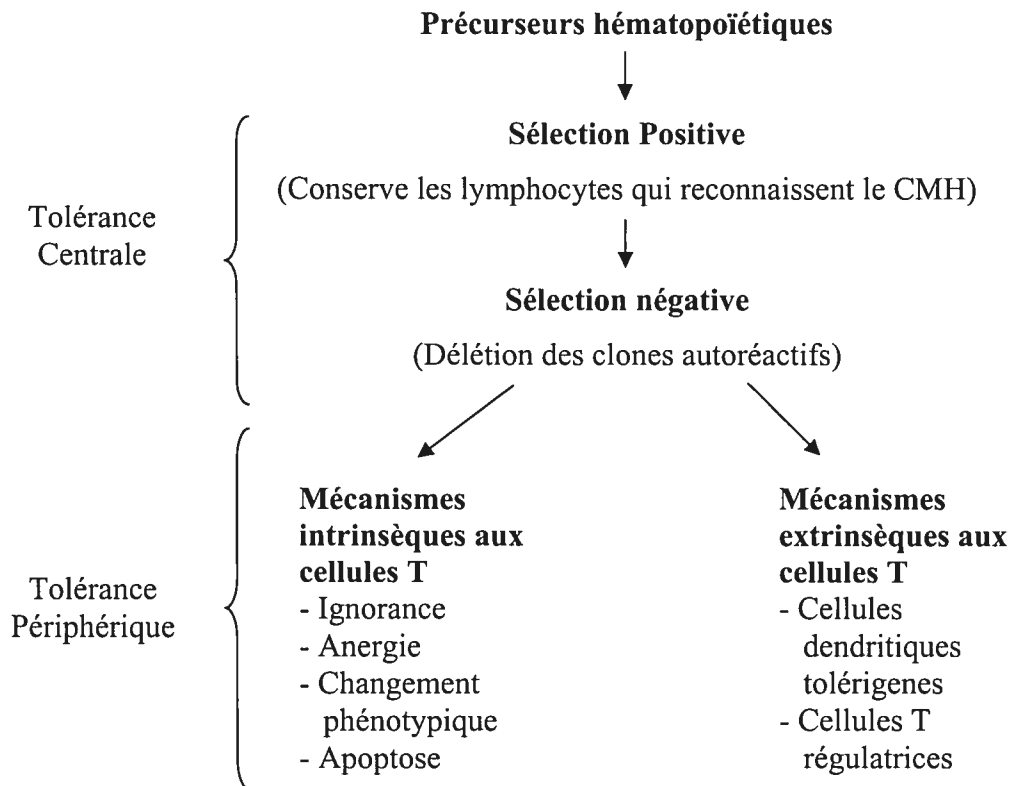


FIGURE 1. Mécanismes de tolérance centrale et périphérique. *Les précurseurs hématopoïétiques migrent aux organes lymphoïdes primaires (moelle, thymus) afin de subir une maturation qui implique une sélection positive et négative. Une fois dans la circulation, un deuxième niveau de régulation entre en jeu : la tolérance périphérique. Celle-ci est effectuée via des mécanismes propres au lymphocyte T ou via d'autres cellules régulatrices. (Figure inspirée de Walker et al., Nature Review, 2001).(4)*

Des mécanismes extrinsèques aux cellules T sont représentés par des populations de cellules qui contrôlent la réponse immunitaire et ont un rôle tolérogénique. L'une de ces populations est celle des cellules dendritiques. Ces dernières sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Ces cellules présentent en tout temps des peptides sur leur CMH et expriment des co-récepteurs activateurs ou inhibiteurs selon l'environnement immunologique. Lorsque la cellule se retrouve dans un contexte d'infection, qu'elle identifie via des récepteurs propres à des constituants commun à plusieurs micro-organismes (ex. : récepteur « toll-like ») ou à des récepteurs de

constituants cellulaires libérés dans un contexte de nécrose (ex. : récepteur pour les « heat shock proteins »), la cellule dendritique exprime davantage de co-récepteurs stimulateurs (4). Inversement, si elle rencontre un lymphocyte spécifique à un antigène, et que celui-ci n'est pas dans un contexte d'infection, elle présentera le peptide de façon à induire la tolérance. Ce phénomène n'est pas encore totalement compris et fait l'objet de nombreuses recherches. Les cellules T régulatrices constituent une autre population capable de réguler l'activité du système immunitaire (8). Ces dernières sont des cellules spécifiques pour certains épitopes du soi et, lorsqu'elles rencontrent un lymphocyte T autoréactif spécifique au même épitope, elles l'inhibent. Ces cellules sont CD4+ et CD25+ mais encore peu est compris sur leur rôle et leur mécanisme exact (9).

Autoimmunité

Malgré tout ces contrôles, certains clones autoréactifs s'échappent et génèrent une réponse contre les constituants du soi, c'est ce que l'on appelle un bris de tolérance. Ce bris de tolérance a été premièrement décrit en 1900 par Paul Ehrlich qui, suite à l'immunisation de chèvres avec des érythrocytes autologues ou non-autologues, a nommé l'autoimmunité observée : *horror autotoxicus* (10). Suite à ces études, l'immunologie s'est plutôt portée sur l'étude des infections et des allergies. Ce n'est qu'en 1929 qu'un étudiant de Ehrlich relancera l'idée d'autoimmunité en effectuant des études sur différentes immunisations avec des tissus hétérologues. Aujourd'hui, les maladies autoimmunes sont mieux connues et on estime qu'elles affectent 3% à 5% de la population générale (11).

Définition et classification

L'autoimmunité est une condition dans laquelle un dommage fonctionnel et/ou structurel est le produit des actions de cellules immunocompétentes ou d'anticorps dirigés contre des constituants normaux du corps (10).

Il existe deux types de maladies autoimmunes : organe-spécifiques et systémiques (12). Une pathologie est qualifiée d'organe-spécifique lorsqu'elle affecte surtout un organe précis. Elle survient lorsque le déterminant antigénique est une protéine spécifique à un seul organe (exemple : la thyroglobuline dans la thyroïdite autoimmune) (11). D'autre part, une maladie autoimmune peut-être qualifiée de systémique lorsqu'elle porte atteinte à plusieurs organes à la fois. Cela se produit entre autres lorsque le déterminant antigénique est ubiquitaire, tel que l'ADN dans le lupus (12).

Il est aussi possible de classifier les maladies autoimmunes selon le principal mécanisme d'atteinte du soi. Les mécanismes de destruction du soi sont les mêmes que ceux qui agissent lors d'une infection, soit les anticorps, les complexes immuns et les cellules T cytotoxiques. Premièrement, certaines atteintes autoimmunes sont la conséquence d'autoanticorps pathogéniques (à différencier des autoanticorps qui sont présents mais qui n'entraînent pas de perte de fonction). Par exemple, dans l'anémie hémolytique autoimmune les patients ont des autoanticorps dirigés contre les globules rouges menant à la lyse de ces cellules par la cascade du complément ou par l'opsonisation (2). Un autre exemple est la myasthénie gravis, dans laquelle les autoanticorps sont dirigés contre le récepteur d'acétylcholine des jonctions neuromusculaires. La liaison de ces anticorps entraîne une perte de fonction du récepteur résultant en une faiblesse musculaire (2, 11).

Des complexes immuns formés par plusieurs anticorps se liant à la même particule antigénique peuvent provoquer une maladie inflammatoire. Le lupus érythémateux disséminé est une maladie où le dommage est fait par des complexes immuns. En effet, chez ces patients il y a une quantité élevée d'IgG anti-ADN. Ces anticorps forment des complexes immuns qui se déposent, entre autres, dans les glomérules des reins, les articulations et les artérioles causant des insuffisances de multiples organes (2).

Enfin, il y a les pathologies dont la destruction du tissu est faite par les cellules T. La thyroïdite autoimmune d'Hashimoto, le diabète de type 1 et la sclérose en plaques en sont des exemples. Dans ces trois pathologies, les cellules T cytotoxiques sont dirigées

contre des antigènes du soi menant à une destruction de l'organe (thyroïdite, diabète et sclérose) ce qui engendre une perte de fonction (perte de la sécrétion d'insuline dans le cas du diabète) (11). Plusieurs maladies autoimmunes produites par des cellules T développent aussi des autoanticorps, fréquemment utilisés comme marqueurs spécifiques de la pathologie (exemple : hépatite autoimmune) (13).

TABLEAU I. Exemples de maladies autoimmunes organe-spécifiques ou systémiques ainsi que leurs autoantigènes ciblés et le mécanisme de destruction associé.

Maladie	Organe malade	Autoantigène	Mécanisme d'atteinte
<u>Maladies autoimmunes organe-spécifiques</u>			
Thyroïdite autoimmune	Thyroïde	Thyroglobuline, thyroïde peroxidase	Cellules T
Gastrite	Estomac	H ⁺ /K ⁺ ATPase, facteur intrinsèque	Cellules T
Maladie Coeliaque	Intestin grêle	Transglutaminase	Cellules T
Maladie de Graves	Thyroïde	Récepteur de l'hormone stimulatrice de la thyroïde (TSH)	Anticorps
Vitiligo	Mélanocytes	Tyrosinase	Cellules T / anticorps
Diabète de type I	Cellules β pancréatiques	Insuline, glutamic acid décarboxilase (GAD)	Cellules T
Sclérose en plaques	Cerveau/ Moelle épinière	Myelin basic protein (MBP), proteolipid protein	Cellules T
Hépatite autoimmune	Foie	Cytochrome P450 2D6, Formiminotransferase cyclodeaminase	Cellules T
Myasthénie gravis	Muscles	Récepteur de l'acétylcholine	Anticorps
Cirrhose biliaire primitive	Canaux biliaires	2-oxoacid dehydrogenase complexes	Cellules T
<u>Maladies autoimmunes systémiques</u>			
Arthrite rhumatoïde	Articulations, poumons, cœur, etc...	IgG, fibrine, filaggrine	Anticorps
Lupus érythémateux disséminé	Peau, articulations, reins, etc...	Antigènes nucléaires	Anticorps

(Tableau inspiré de Marrack et al., Nature Medicine, 2001.)(11)

Étiologie

Dans la plupart des maladies autoimmunes, l'étiologie est inconnue. En effet, l'une des particularités des maladies autoimmunes est qu'elles sont multifactorielles, étant le fruit de l'interaction de facteurs environnementaux et de facteurs génétiques, en plus d'être influencées par l'âge et le sexe du patient.

Influence du sexe

Dès les premières descriptions de maladies autoimmunes, il y a environ 100 ans, il a été noté que les femmes étaient plus fréquemment atteintes que les hommes. En effet, pour la majorité des pathologies autoimmunes, on retrouve une discordance de la distribution homme/femme plus ou moins marquée selon les maladies (voir FIGURE 2) (14). Les différences les plus frappantes se retrouvent entre les patients avec un Syndrome de Sjögren, un lupus érythémateux, une thyroïdite autoimmune et une sclérodermie où plus de 80% des patients sont des femmes (14). Cette différence n'est pas encore totalement comprise mais il existe des différences de base dans l'immunologie « normale » entre les hommes et les femmes. En effet, les femmes auraient un nombre absolu de CD4+ plus élevé (15) et une plus grande production de cytokines Th1 que les hommes (14). De plus, certaines évidences indiqueraient que les hormones stéroïdiennes auraient un effet modulateur sur la présentation d'antigène, l'activation des lymphocytes, l'expression des gènes des cytokines et la migration des cellules immunitaires (14, 16).

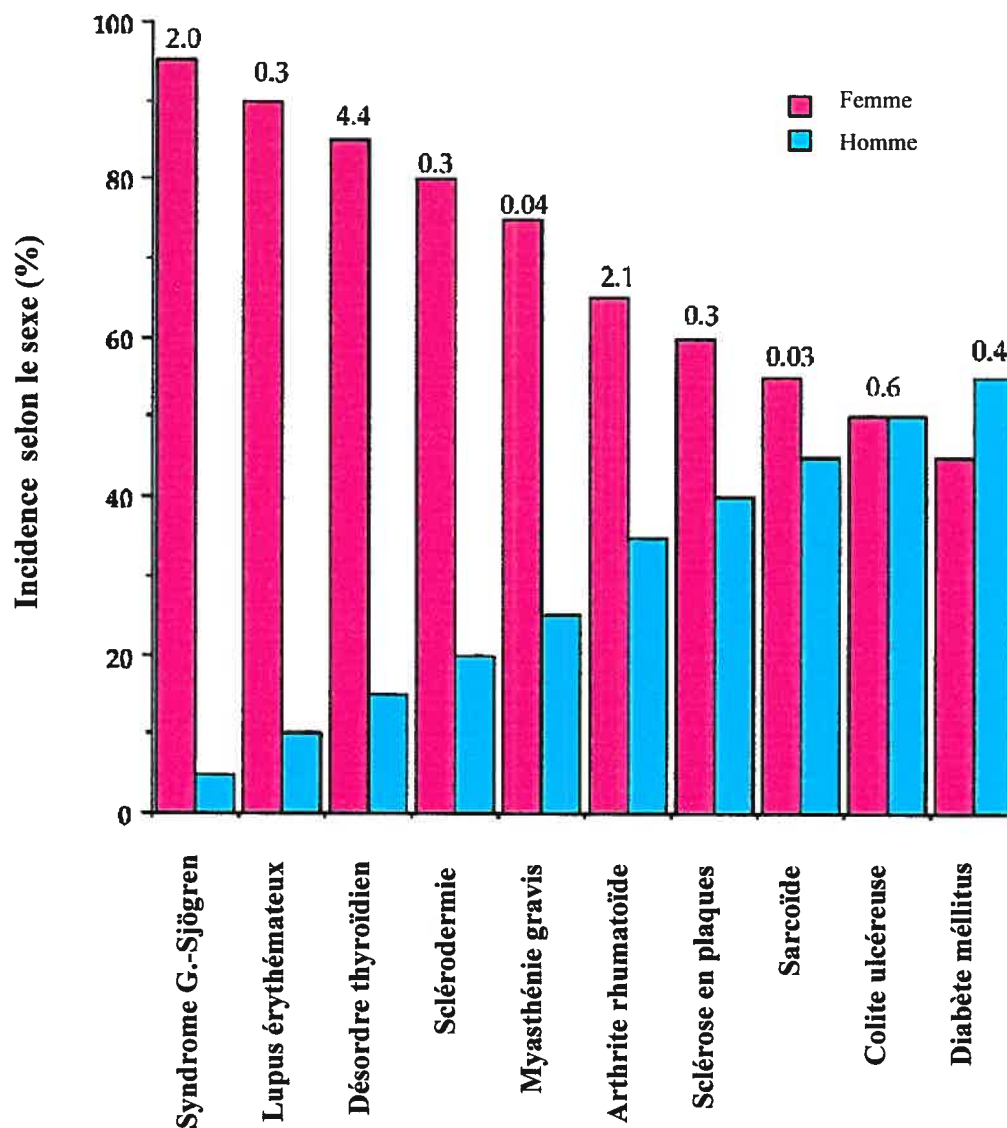


FIGURE 2 : Distribution selon le sexe et prévalence des principales maladies autoimmunes. Les chiffres au-dessus des barres indiquent le nombre total de cas par 100 000 habitants aux Etats-Unis. (Figure tirée de Whitacre, *Nature Immunology*, 2001.) (14)

Le sexe n'est pas le seul facteur à influencer le développement et/ou la progression d'une maladie auto-immune. Les changements hormonaux subis lors d'une grossesse ou lors de la ménopause ont un effet direct ou indirect sur le système immunitaire. En effet, certaines maladies autoimmunes, telle que l'hépatite auto-immune, vont s'améliorer lors

d'une grossesse (16). Cette rémission est particulièrement évidente au cours du troisième trimestre de la grossesse alors que les niveaux de progestérone et d'oestradiol sont très élevés. Par opposition, on peut observer le lupus s'aggraver au cours de la même période (16). Le changement du statut de la maladie peut être expliqué en partie par l'observation d'une dominance de la réponse immunitaire Th2, plutôt que Th1, au cours de la grossesse (17, 18). Toutefois, cette notion ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique. De plus, le fait que le trophoblaste sécrète des facteurs immunosuppresseurs aurait pour effet d'inhiber la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et l'activité lytique des cellules NK (13). Finalement, des évidences épidémiologiques nous indiquent que les changements hormonaux au cours de la vie d'une femme auraient un effet puisque, par exemple, dans l'hépatite autoimmune l'incidence est plus grande chez les jeunes filles à l'âge pré-pubère et chez les femmes ménopausées (13). Très peu encore est compris et de plus amples études sont requises afin de vraiment cerner ce phénomène.

Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques ont un grand rôle à jouer dans l'incidence des maladies autoimmunes. En effet, il existe une différence dans l'incidence des maladies autoimmunes entre jumeaux monozygotes et jumeaux hétérozygotes (12). De plus, il est fréquent que des patients atteints de lupus aient des membres de leur familles qui présentent des maladies autoimmunes systémiques ou même organe-spécifiques (11). Il n'existe pas un gène pour chaque maladie autoimmune; en effet, la majorité de ces maladies sont multigéniques et les gènes ciblés ne confèrent qu'une susceptibilité à la maladie. Il est évident que les gènes mis en avant plan sont ceux associés aux CMH, car ces protéines participent directement à la présentation des antigènes et à la tolérance. En effet, la plupart des pathologies autoimmunes sont liées à un haplotype particulier du CMH, soit en tant que « protecteur » ou comme responsable d'une susceptibilité. Par exemple, l'allèle HLA-DQB1*0602 protège du diabète de type 1 alors que les allèles HLA-DQB1*0301 ou HLA-DQB1*0302 sont des gènes de susceptibilité (19). D'autre part, les allèles HLA-DRB1*0401 et DRB1*0404 du CMH de classe II sont associées à

l'arthrite rhumatoïde chez les descendants des européens du nord mais non chez les noirs ou les métisses d'Amérique centrale (11, 12).

D'autres gènes en dehors du locus du CMH sont aussi impliqués dans la susceptibilité aux maladies autoimmunes. Les régions de gènes qui affectent l'expression de l'autoantigène, tels que les promoteurs, peuvent influencer la réponse immunitaire. En effet, dans le diabète de type 1, un polymorphisme dans le nombre de répétitions d'un segment du locus IDDM2 influence l'expression de l'insuline dans le thymus, ayant un effet direct sur la tolérance centrale (20). D'autre part, il y a des gènes qui ont une influence sur l'immunoréactivité, tels que ceux qui codent pour l'IL-2 ou le CTLA-4 (21). Des polymorphismes dans le gène codant pour CTLA-4 sont associés à une susceptibilité au diabète de type 1 et à la maladie coeliaque (11). Donc, plusieurs polymorphismes de gènes, qui sont sans conséquence si pris individuellement, sont associés à une plus grande susceptibilité aux maladies autoimmunes, surtout si plusieurs de ces polymorphismes sont présents. L'interaction des gènes de susceptibilité avec des facteurs environnementaux provoque une modification de la réponse vers l'autoimmunité.

Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux qui participent au déclenchement d'une maladie autoimmune sont des infections ou des traumatismes physiques qui modulent le système immunitaire. Ces facteurs peuvent influencer la réponse immunitaire par plusieurs mécanismes tels que la libération d'antigènes du soi, l'action d'un superantigène, l'augmentation de l'expression du CMH de classe II, la stimulation des cellules dendritiques, la production de cytokines (stimulation « bystander »), et le phénomène de mimétisme moléculaire (1, 2, 11, 12, 22-24).

Tout d'abord, des atteintes qui affectent directement un tissu, provoquant ainsi la libération d'antigènes, peuvent générer, dans un contexte génétique favorable, une réponse autoimmune. C'est ce que l'on observe lorsqu'il y a un traumatisme, telle qu'une infection ou une blessure physique à un organe en particulier. Un bris aux

cellules ou encore à des sites immunoprivilégiés tels que l'œil ou les testicules entraînera une relâche des autoantigènes. À ce moment, certaines protéines qui étaient restées cachées du système immunitaire se retrouvent exposées et peuvent activer des clones autoréactifs retenus dans un stade d'ignorance en raison du manque de contact avec leur antigène. Un bon exemple est observé dans l'ophtalmie sympathique. Dans ce cas, lorsqu'un œil subit un traumatisme, une réponse autoimmune se développe contre l'œil affecté, mais elle peut aussi se propager à l'œil intact (1, 11). Si le traumatisme engendre une réponse inflammatoire, il y aura plus de chance que les lymphocytes autoréactifs soient activés puisque l'environnement immédiat favorisera une présentation efficace de l'antigène. C'est ce que l'on observe lors d'une ischémie cardiaque. Une inflammation s'installe et provoque une réponse autoimmune spécifique au cœur (12).

L'inflammation elle-même, qu'elle soit déclenchée par une infection ou autre mécanisme, peut moduler le système immunitaire de façon à perturber la présentation des antigènes et induire une réponse dirigée contre le soi. Les cytokines présentes au site d'inflammation peuvent induire une activation polyclonale non spécifique. De la même façon, les agents microbiens tels que les lipopolysaccharides (LPS) peuvent servir d'adjuvant et activer des clones autoréactifs en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De plus, ils augmentent la présentation des antigènes en induisant l'expression des CMH de classe II et d'autres protéines co-stimulatrices telles que B7-2 et OX40L (11). Ces constituants bactériens stimulent la migration des cellules dendritiques aux organes lymphoïdes secondaires où ils interagissent avec un nombre plus important de lymphocytes. Finalement, il est proposé que certaines protéines cellulaires relâchées lors de la nécrose causée par une infection, telles que les « heat-shock proteins », activeraient les cellules dendritiques qui présenteraient, dans un contexte favorable, de multiples antigènes existant dans le milieu, qu'ils soient du soi ou non (4). Tout ceci a pour effet de stimuler le système immunitaire, provoquer une présentation d'antigène favorable à une réponse forte et d'activer des clones autoréactifs qui auraient dû rester quiescents.

Finalement, une autre théorie pour expliquer le déclenchement d'une autoimmunité est celle du mimétisme moléculaire. Ce dernier surviendrait lorsqu'un agent infectieux engendre des clones réactifs contre ses déterminants antigéniques, qui eux sont assez semblables à des épitopes du soi pour induire une réaction croisée. À ce moment, les lymphocytes « spécifiques » à l'agent infectieux reconnaîtraient des épitopes semblables, mais appartenant au soi, menant à une destruction de la cible. Avec le temps, la réponse immunitaire s'affinerait contre l'épitope du soi engendrant une réactivité plus spécifique. Ce phénomène est permis par la plasticité des récepteurs des lymphocytes B et T qui leur confère la possibilité de reconnaître plus d'un épitope (25). Le mimétisme moléculaire peut aussi se produire au niveau des lymphocytes T mémoires. Ces lymphocytes sont beaucoup plus faciles à activer que des lymphocytes naïfs, alors une stimulation moins spécifique aurait la possibilité d'activer un clone T mémoire qui réagirait également contre le soi (22). La ressemblance entre les épitopes du soi et du non soi n'est pas nécessairement dans la séquence peptidique, mais peut aussi s'observer dans la structure de l'épitope (26). La majorité des anticorps circulants sont dirigés contre des épitopes conformationnels, ces anticorps lient les protéines dans leur conformation tridimensionnelle (27). Les contacts avec les anticorps seraient faits par les chaînes des acides aminés (27-29). De ce fait, la ressemblance entre deux épitopes, du soi et du non soi, se retrouverait entre des acides aminés semblables au niveau de leur charge, de leur taille et de leur conformation (26).

La théorie du mimétisme moléculaire est proposée pour expliquer quelques maladies autoimmunes, telles que la sclérose en plaque et l'arthrite rhumatoïde (TABLEAU II). Toutefois, cette théorie est difficile à prouver hors de tout doute, puisque le système immunitaire affine sa réponse contre le soi, la rendant différente à la réponse initiale. Elle demeure malgré tout généralement acceptée dans la communauté scientifique (26). Quatre conditions sont essentielles afin d'établir un lien de mimétisme moléculaire entre une maladie auto-immune et des microorganismes : 1) une association épidémiologique entre des agents infectieux et la maladie, 2) l'identification de cellules T et/ou anticorps dirigés contre des constituants du soi, 3) l'identification d'un mimétisme entre la cible et l'agent infectieux, 4) la reproduction de la maladie chez un animal via cet antigène (30).

TABLEAU II. Exemples de quelques maladies autoimmunes pour lesquelles le mimétisme moléculaire est proposé comme facteur déclencheur et modèle animal reproduisant ce mécanisme.

Maladie Autoimmune	Autoantigène	Pathogène proposé	Réaction croisée	Modèle animal
Diabète de type I	GAD65	Coxsackievirus	Cellules T (controversé chez l'humain)	Souris tg LCMV-RIP
Arthrite rhumatoïde	HLA-DRB1	40kD heat-shock protein	Cellules T et B	-
Arthrite rhumatoïde	Heat-shock protein 60	Heat-shock protein 65 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cellules T et B	Arthrite par adjuvant
Sclérose en plaques	Myelin basic protein	Multiples virus	Cellules T	Souris transgéniques LCMV-oligodendrocyte
Spondyloarthropathies	HLA-B27	Multiples bactéries gram négatif	Cellules B	-
Maladie de Graves	Récepteur de la thyrotropine	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cellules B	-
Rhumatisme articulaire aigu	Myosine cardiaque	M protein du Streptococcus	Cellules B	-
Myocardite	Myosine	Chlamydia	Cellules T et B	-
Myasthénie gravis	Récepteur de l'acétylcholine	Herpes simplex	Cellules B	-

(Tiré de Alberts et al., The New England Journal of Medecine, 1999. et de Marrak et al., Nature Medecine, 2001.)(11, 26)

En résumé, l'autoimmunité est déclenchée par des facteurs environnementaux dans un contexte génétique, d'âge et de sexe particuliers (FIGURE 3). La rareté de cette coïncidence explique, peut être en partie, la faible incidence des maladies autoimmunes.

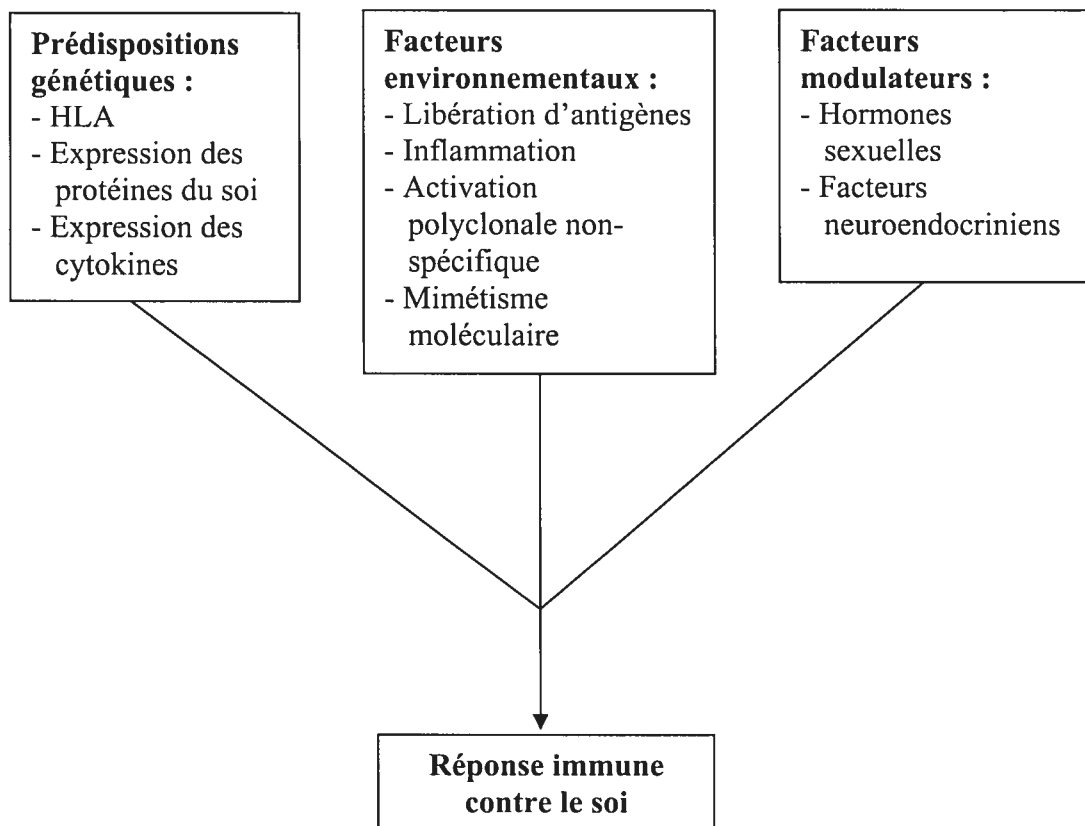


FIGURE 3. Résumé des principaux facteurs menant à une réponse auto-immune.
Seuls quelques exemples sont cités pour chacun des facteurs prédisposants.

Progression de l'autoimmunité

Une fois la réponse autoimmune enclenchée, elle évolue et se raffine. Elle se dirige contre de nouveaux épitopes, contre des nouvelles protéines du soi et évolue vers la chronicité. Cette progression utilise les mêmes mécanismes de raffinement qu'une réponse immune contre une infection soit, par exemple, par les hypermutations somatiques et le phénomène d' «epitope spreading». Grâce aux hypermutations somatiques, les lymphocytes B augmentent leur affinité pour l'autoantigène. De plus, les lymphocytes B autoréactifs présentent aux lymphocytes T naïfs d'autres peptides (provenant de la même protéine), demeurés jusqu'alors cachés du système immunitaire, ce qui a pour conséquence d'activer de nouveaux clones autoréactifs. Le phénomène d' «epitope spreading» permet de recruter et d'activer un plus grand nombre de lymphocytes autoréactifs (12, 27, 31, 32). Le phénomène d' «epitope spreading» supporte aussi la théorie du mimétisme moléculaire car une dégénérescence et un élargissement de la réponse immune à un agent infectieux peut mener à l'activation de clones autoréactifs (27).

Autoimmunités et infections

Des réponses autoimmunes sont observées chez presque tous les individus en santé et représentent un phénomène normal. Cette réponse est considérée anormale lorsqu'elle devient pathogénique. De même, certaines infections virales chroniques provoquent une réponse autoimmune sous-jacente, mais leur rôle pathogénique est discutable. Les mécanismes responsables de l'apparition d'une autoimmunité chez ces patients restent à découvrir. C'est le cas de l'infection avec le virus de l'hépatite B où l'on a retrouvé des autoanticorps anti-cardiolipine (33). De même, chez certains patients infectés par le virus d'immunodéficience humaine, il est possible de retrouver de multiples autoanticorps tels que des anti-noyau, des anti-cardiolipine et des anti-cytoplasme de neutrophiles (34). De plus, il a été décrit que dans l'infection chronique au virus de l'hépatite C (VHC) plusieurs autoanticorps spécifiques au foie (anti-liver kidney microsomes-1 (anti-LKM1)) ou non (anti-noyau, anti-muscle lisse, etc.) sont retrouvés (35-38).

Hépatite autoimmune

Historique

C'est en 1950 que le médecin suédois Jan Waldenström a décrit pour la toute première fois, dans le premier congrès de la « German Society for Digestive and Metabolic Disorders » suivant la deuxième guerre mondiale, un groupe de patients qui présentait des symptômes de ce que l'on nomme aujourd'hui une hépatite autoimmune (HAI) (39, 40). Ces patientes présentaient une aménorrhée prolongée, une hypergammaglobulinémie et répondaient bien à l'injection d'hormone adénocorticotropique (ACTH). Au même moment, le Dr Henry George Kunkel publiait un résumé, menant plus tard à un article, qui décrivait un phénotype de jeunes patients, de prédominance féminine, avec une hépatite chronique qui débutait de façon insidieuse, associée à une hypergammaglobulinémie.

À l'époque, le concept d'hépatite chronique était encore un sujet de débat et le terme s'appliquait à une maladie asymptomatique qui présentait tout de même un bilan biochimique anormal. D'autre part, l'on associait le qualificatif « actif » lorsque la maladie engendrait des symptômes. Dans ce contexte, ce que l'on appelle hépatite autoimmune aujourd'hui a été nommé hépatite chronique active. C'est récemment qu'un groupe international d'experts a proposé le terme d'hépatite autoimmune (39, 41).

En 1955, Joske et King ont découvert des cellules de lupus érythémateux chez une patiente atteinte d'HAI (42). Mackay confirma cette observation en 1956, alors qu'il retrouvait ce type de cellules chez 5 de ses patients (43). Ces résultats ont mené au rapprochement de l'hépatite autoimmune et du lupus allant même jusqu'à donner le nom d'hépatite lupoïde à l'HAI. Avec les années, il est devenu évident que le lupus et l'HAI étaient rarement associés et ce qu'on observait était des anticorps anti-noyau différents de ceux rencontrés dans le lupus (39, 44).

Plusieurs années de recherche ont apporté une connaissance plus précise sur les caractéristiques cliniques et biologiques de l'hépatite autoimmune, tels que l'incidence selon l'âge et le sexe. Afin de faire une revue de la littérature de façon exhaustive et de poser des critères de base pour un diagnostic de l'hépatite autoimmune, un groupe international s'est réuni en 1992 et en 1999. Il a publié un système de points pour faciliter le diagnostic et a pris des décisions sur la classification de la maladie selon des critères cliniques, de laboratoire et histologiques présent chez les patients (45). Aujourd'hui, c'est sur ces critères que sont basés le diagnostic, le traitement et les grandes lignes de recherche sur l'hépatite autoimmune.

Définition

L'hépatite autoimmune est une maladie d'étiologie inconnue qui entraîne une destruction progressive du parenchyme hépatique. Comme la majeure partie des maladies autoimmunes, l'HAI est multifactorielle, étant le produit d'une interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux. Elle est caractérisée par une hypergammaglobulinémie, des autoanticorps circulants et un faible niveau de facteur 4 du complément (13, 46). Fréquemment, d'autres atteintes autoimmunes sont associées à l'HAI. Elle progresse vers une cirrhose et une insuffisance hépatique et peut mener à la greffe hépatique si elle n'est pas traitée. De façon générale, les patients atteints d'HAI répondent bien aux traitements immunosuppresseurs.

Les symptômes peuvent être spécifiques, telle qu'une atteinte hépatite aiguë, et non spécifiques, tel que la fatigue, une perte de poids, une anorexie. La majorité des patients présentent une hépatomégalie et un taux de transaminases élevé. Chez 50%, une splénomégalie est aussi observée.

Diagnostic

Une grille de score a été établie par le Groupe International d'Hépatite Autoimmune afin d'établir un diagnostic précis d'une hépatite autoimmune qualifiée de « certaine » ou « probable » (voir TABLEAU III) (45). Cette grille se base sur différents critères soit l'histologie du foie, la présence d'autoanticorps, l'absence d'infections virales, l'absence d'intoxication par une substance hépatotoxique (ex.: halothane, alcool), la prédisposition génétique et la réponse au traitement. Si le score obtenu se situe au-delà de 15 avant traitement et au-delà de 17 après traitement, le diagnostic est « HAI certaine ». D'autre part, si le score obtenu se situe entre 10 et 15 avant traitement et entre 12 et 17 après traitement, le diagnostic est « HAI probable ».

TABLEAU III : Grille de score pour le diagnostic de l'hépatite autoimmune

Paramètres	Points
Sexe	
Femme	2/ 0
Biochimie	
Ratio PAL/ALAT : >3/ <3	-2/ +2
Gammaglobuline (n x limite supérieure de la normale) >2/1.5-2/1-1.5/<1	+3/ +2/ +1/ 0
Titre d'autoanticorps	
ANA, SMA ou LKM1 > 1 :80/ 1 :80/ 1 :40/ <1 :40	+3/+2/+1/0
Anticorps anti-mitochondries +/-	-2/0
Marqueurs viraux	
IgM anti-VHA, HbsAg ou IgM anti-HBc +	-3
Anti-VHC par ELISA ou RIBA	-2
ARN VHC + par PCR	-3
Infection active par un autre virus	-3
Marqueurs viraux précédemment négatifs	+3
Autres facteurs étiologiques	
Utilisation récente d'un médicament hépatotoxique ou exposition à des produits sanguins : oui/non	-2/+1
Consommation moyenne d'alcool	
Homme < 35g/j, Femme < 25g/j	+2
Homme 35-50 g/j, Femme 25-40 g/j	0
Homme 50-80 g/j, Femme 40-60g/j	-1
Homme > 80g/j, Femme > 60g/j	-2
Facteurs génétiques	
Autres maladies autoimmunes chez patient ou chez un parent au premier degré	+1
Halotype HLA B8-DR3 ou DR4	+1
Histologie	
Hépatite chronique active avec « piecemeal necrosis »	+3
Atteinte lobulaire et nécrose en pont – Nécrose en pont sans atteinte lobulaire	+2
Aspect de cellules en rosette	+1
Présence d'un infiltrat plasmocytaire prédominant ou marqué	+1
Atteinte biliaire	-1
Autre type d'atteinte (granulome, surcharge ferrique ou cuivrique) suggérant une autre cause	-3
Aucune atteinte histologique	
Réponse à la corticothérapie	
Réponse complète	+2
Aucune réponse	+2
Rechute	+3

Classification

L'HAI est classée en deux types selon les autoanticorps circulant dans le sérum des patients. Ces anticorps sont des outils importants dans le diagnostic de la maladie puisque certains d'entre eux sont spécifiques à l'hépatite autoimmune. L'hépatite autoimmune de type I est caractérisée par la présence d'autoanticorps anti-muscle lisse (SMA) et/ou anti-noyau (ANA) (voir TABLEAU IV). Ces autoanticorps ne sont pas spécifiques à l'HAI puisqu'ils sont retrouvés dans d'autres pathologies et dans la population générale (48, 49). Une explication à ce phénomène est la variété d'autoantigènes potentiels dans le muscle lisse. Les autoanticorps anti-SMA dirigés contre les filaments d'actine semblent être plus fréquents chez les patients avec HAI que chez des individus avec d'autres maladies (49).

D'autre part, l'hépatite autoimmune de type II est définie par la présence d'autoanticorps « anti-liver kidney microsome I » (anti-LKM1) et/ou des anti-cytosol de foie I (anti-LC1) (45). Ces autoanticorps sont considérés comme spécifiques à l'HAI puisqu'ils ne sont pas retrouvés dans d'autres pathologies, sauf pour la présence des anti-LKM1 chez 5% des patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C (36, 50). Des différences cliniques existent entre les deux types d'hépatite autoimmune telle qu'une plus grande prévalence féminine pour le type II (90% vs 70% pour les types I). L'HAI de type II touche surtout la population pédiatrique et est la plus rare des deux formes. En effet, 80% des HAI de type II sont diagnostiqués dans les groupes pédiatriques par rapport à 40% pour le type I (13).

Un troisième type, caractérisé par la présence « d'anti-soluble liver protein » (anti-SLA/LP), a été proposé par Manns et *al.* en 1987 (51) mais la signification clinique n'a pas été montrée pour qu'une subdivision supplémentaire soit nécessaire (52). De plus, des anti-SLA/LP ont été retrouvés en association avec des anti-LKM1, des anti-LC1, des ANA et des SMA rendant cet autoanticorps non-spécifique à un type d'HAI en particulier (53). Nous reviendrons plus en détails sur ces autoanticorps et leur antigène.

TABLEAU IV: Autoanticorps retrouvés chez les enfants atteints de l'hépatite autoimmune

Type d'HAI	Autoanticorps	Autoantigènes	Fréquence (%)
1	SMA	Actine-F	90-100%
	ANA	Varié	0-10%
	SMA/ANA		40-60%
2	LKM1	CYP2D6	40-45%
	LC1	FTCD	20-25%
	LKM1/LC1		35-40%

* Tableau tiré de Alvarez, *Liver Diseases in Children*. 2nd ed., 2001.(13)

D'autres autoanticorps sont aussi retrouvés chez les patients atteints d'hépatite autoimmune, mais ces derniers ne sont pas utilisés pour le diagnostic. Des autoanticorps anti-récepteur de l'asiaglycoprotéine (anti-ASGP-R) sont retrouvés dans 75% des cas d'HAI type I et chez 40% des enfants HAI type II (13). Il est aussi possible de retrouver des hauts titres d'anti-cytoplasme de neutrophile (pANCA) chez près de 90% des patients (54).

Histologie

L'histologie est un outil important dans le diagnostic et le suivi des patients avec HAI puisqu'il révèle le degré d'atteinte et la sévérité de la maladie. Soixante à 80% des enfants atteints d'HAI ont une inflammation hépatique, modérée à sévère, portale et lobulaire et une hépatite d'interface (voir FIGURE 4) (13). De plus, 50% des biopsies présentent un certain degré de nécrose. En effet, la présence d'une cirrhose au diagnostic est un facteur clé dans le pronostic du patient. Le développement lent de la maladie et son caractère fluctuant seraient responsables de la présence de cette cirrhose. Certaines études ont observé une résorption de la fibrose suite au traitement. D'autre part, l'histologie du foie de 10%-20% des patients révèle des hépatocytes géants polynucléés.

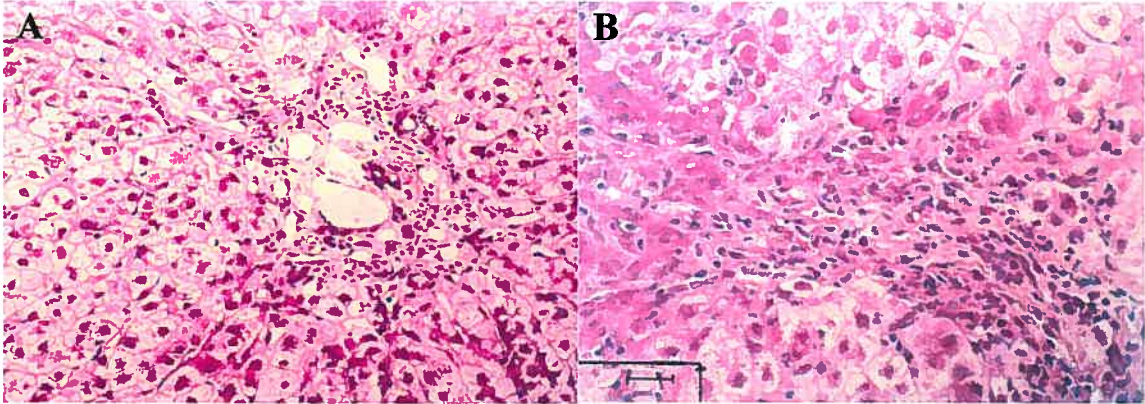


FIGURE 4 : Exemple d'inflammation hépatique dans l'hépatite autoimmune. *Infiltration hépatique péri-portale (A) et lobulaire (B) de biopsies de patients atteints d'hépatite autoimmune de type I.*

Prévalence, âge et sexe

En 1997, on estimait que l'hépatite autoimmune affectait 100 000 à 200 000 personnes aux Etats-Unis (55). Sa prévalence chez les Européens caucasiens serait de 16,9 personnes atteintes pour 100 000 (56). L'HAI serait la cause de 2,6% à 5,9% des transplantations hépatiques (57, 58).

L'hépatite autoimmune est une maladie qui touche particulièrement la population pédiatrique, le pic d'atteinte se trouvant chez les jeunes filles pré-pubères. Toutefois, une distribution bimodale de la maladie est décrite puisqu'un deuxième pic est observé entre la quatrième et la sixième décennie de vie (54). La moyenne d'âge au diagnostic se situe à 10 ans pour les patients atteints du type I et 6,5 ans pour les patients avec une HAI de type II (13). Comme la majeure partie des maladies autoimmunes, l'HAI touche plus de femmes que d'hommes. La proportion de femmes atteintes est de 70% pour le type I et de 90% pour le type II (13).

Traitements

L'hépatite autoimmune est traitée principalement par des thérapies immunosuppressives non spécifiques entraînant de multiples effets secondaires non désirables (54). Chez les enfants, la combinaison de prednisone et d'azathioprine est le traitement utilisé depuis

plus de vingt ans (13). Une réponse satisfaisante à cette thérapie est observée dans 80% des cas. Toutefois, les patients qui présentent une maladie sévère aiguë ne répondent pas toujours bien au traitement (46, 54). D'autres thérapies ont été utilisées récemment pour le traitement des patients cortico-résistants ou d'emblée. Malheureusement, 10% à 20% des enfants devront avoir recours à une transplantation hépatique (46).

Génétique

L'hépatite autoimmune comporte une composante génétique qui implique la présentation de l'autoantigène, la réponse des lymphocytes et la sécrétion de cytokines. La présence d'une maladie autoimmune est fréquente dans les familles des patients avec HAI. D'autres cas d'hépatite autoimmune dans une même famille est un événement plutôt rare.

Tout d'abord, les différents allèles du CMH représentent des facteurs de risque pour l'hépatite autoimmune. Dans la population caucasienne de l'Europe du nord et de l'Amérique du Nord, les HLA A1-B8-DR3 et HLA DR4 sont reconnus comme le premier et second, respectivement, facteurs de risque pour l'HAI de type 1 (59-61). Ces facteurs de risques sont indépendants l'un de l'autre. D'autre part, dans la population japonaise, le principal allèle de susceptibilité est le DRB1*0405 (62), soit le même que pour la population adulte de l'Argentine. Chez les Mexicains, l'allèle DRB1*0404 est associé avec l'HAI (63) tandis que le DRB1*13 et DRB1*03 le sont pour les Brésiliens (64). D'autre part, dans la population pédiatrique, les allèles DRB1*03 et DRB1*1301 sont retrouvés plus fréquemment chez les patients pédiatriques caucasiens atteints d'HAI de type 1 (65-67). Ces allèles sont d'ailleurs transmis avec un déséquilibre de liaison des parents hétérozygotes aux patients de type 1 (67). Dans cette même population, le HLA-DQB1 est associé au type 2 (67).

Un fait intéressant est que le motif de 6 acides aminés LLEQKR à la position 67-72 sur le polypeptide DR β est présent chez 94% des patients de type I (60, 61). Les allèles DRB1*0301 et *0401 codent tous deux pour ce motif tandis que le *0405 et *0404 ne

différent que d'un acide aminé à la position 71. De façon opposé, l'allèle DRB1*1501, qui confère une « résistance » à l'HAI code pour ILEQAR, soit un isoleucine à la place d'une alanine en position 71 (61). Ce motif est retrouvé sur la septième poche du CMH et peut influencer la liaison, l'orientation du peptide antigénique et l'interaction de la cellule T à l'autoantigène présenté par la cellule. De plus, le fait que l'alanine soit un acide aminé non-polaire et neutre, contrairement à la lysine qui est chargée et polaire, les différences au niveau de l'interaction seraient d'autant plus importantes (68). (voir FIGURE 5)

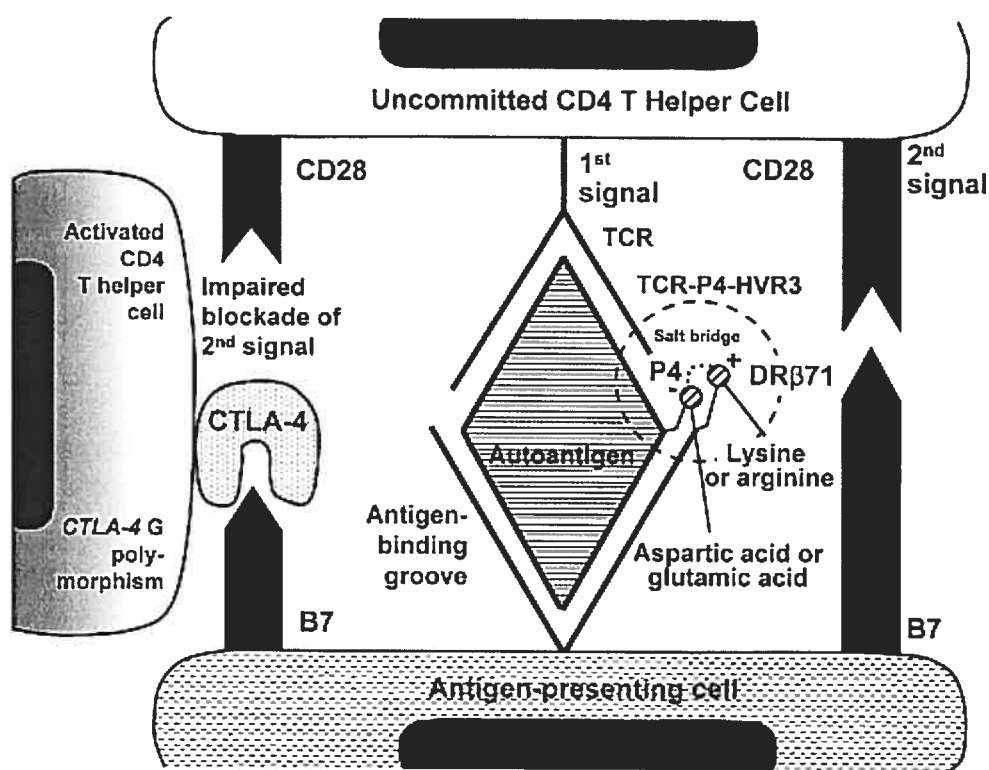


FIGURE 5 : Mécanismes de présentation d'un autoantigène à une cellule CD4 naïve par la molécule HLA DR. L'autoantigène est orienté d'une façon particulière dans la poche du CMH par un pont salin entre la lysine ou l'arginine en position 71. Le complexe HLA DR-peptide est reconnu par le TCR d'une cellule CD4 naïve formant le premier signal. Le second signal est donné par la molécule B7 à la surface de la CPA au CD28 du CD4. Ce dernier signal peut être bloqué par le CTLA-4 qui est exprimé sur les cellules CD4⁺ activées. Le polymorphisme du gène codant pour la protéine CTLA-4 et qui code pour une guanine au lieu d'une adénine en position 49 peut nuire à la fonction bloquante de CTLA-4 et entraîner ainsi une quantité plus importante de CD4⁺ activées. (figure tirée de Czaja et al., *American Journal of Gastroenterology*, 2001)(69)

Outre le CMH, des polymorphismes d'autres gènes peuvent entraîner une susceptibilité à l'hépatite autoimmune. En effet, le polymorphisme de la protéine CTLA-4, une protéine qui a un effet inhibiteur au niveau de l'activation des lymphocytes T, pourrait être associée à un fonctionnement moins efficace de cette protéine, menant à l'activation d'une plus grande quantité de cellules CD4⁺ (voir FIGURE 5). Chez les patients atteints d'HAI de type I, le génotype AG au lieu de AA à la position 49 est retrouvé plus fréquemment chez ces patients que dans la population générale. Les patients ayant ce génotype ont une maladie plus sévère avec un taux de transaminases plus élevé dans le sérum (70, 71). De plus, cet allèle est transmis plus fréquemment que prédit, par les parents hétérozygotes aux patients atteints d'HAI de type 1, ce qui n'est pas retrouvé dans le type 2 (71). Fait intéressant, un polymorphisme au niveau du CTLA-4 a aussi été décrit dans le diabète autoimmun, la cirrhose biliaire primitive et la thyroïdite autoimmune (68).

Des niveaux faibles du facteur 4 du complément sont retrouvés chez 69% des patients HAI. Ce facteur joue un rôle important dans la voie classique du complément. La délétion de ce gène peut entraîner plusieurs problèmes immunitaires (REF). De plus, cette délétion a un déséquilibre de liaison avec le HLA A1, B8 et DR3. Elle est donc retrouvée fréquemment chez les patients atteints de l'hépatite autoimmune. Ces patients développent la maladie à un plus jeune âge que ceux sans la délétion (13).

Finalement, un polymorphisme particulier au niveau des cytokines peut influencer le développement d'une HAI. Ce fait est observé avec le promoteur du gène du TNF- α , le TNFA. L'allèle *2 de ce gène code pour une adénine au lieu d'une guanine et il est retrouvé plus souvent chez les patients HAI. Ceci résulte en un niveau plus élevé de TNF- α circulant, qu'il soit exprimé de façon constitutive ou induit. Ces patients sont plus jeunes et répondent souvent mal au traitement, surtout lorsqu'ils sont homozygotes pour cet allèle (72).

Pathophysiologie

L'infiltration lymphocytaire dans le foie des patients atteints d'hépatite autoimmune, lorsque étudiée par immunohistochimie, présente une majorité de cellules T CD4+. L'immunohistochimie a révélé en plus la présence, en moins grande proportion, de cellules T CD8+, quelques cellules NK, lymphocytes B et macrophages (73). Ces évidences suggèrent que les CD4+ joueraient un rôle de chef d'orchestre dans le dommage cellulaire. Les CD4+ sont activés par des cellules présentatrices d'antigènes qui présenteront des autoantigènes dans une molécule de CMH de classe II. Ces autoantigènes doivent être libérés pour être présentés dans un contexte favorable à l'autoimmunité mais l'atteinte initiale, pour l'HAI, n'a pas encore été élucidée. Une infection virale ou une atteinte hépatique chimique sont soupçonnées d'être un facteur déclencheur. Les mécanismes décrits plus haut concernant la pathogenèse des maladies autoimmunes en général s'appliquent à l'HAI.

En outre, il a été trouvé que les hépatocytes peuvent exprimer le CMH de classe II en présence d'interleukine 12, d'interleukine 2 et d'interféron- γ sécrétés par les cellules Th1 (74). En exprimant le CMH de classe II, les hépatocytes peuvent présenter leurs propres protéines dans un contexte plus favorable pour une réponse immunitaire, aidée par un microenvironnement riche en cytokines pro-inflammatoires. Ces mêmes cytokines augmentent l'expression du CMH de classe I à la surface des hépatocytes, les rendant ainsi plus vulnérables à la destruction par les cellules T cytotoxiques activées. La sécrétion de cytokines perpétue donc le cycle de reconnaissance des antigènes du soi et la progression de la destruction hépatique.

Les cytokines influencent l'apparition, l'expression clinique et l'évolution de la maladie. Entre autre, il a été trouvé que les patients adultes atteints d'HAI de type 1 avaient moins d'interleukine-2 et d'interleukine-4 dans leur sérum qu'un adulte sain (75). Par ailleurs, les cytokines de type Th1 prédominent dans le foie lors de l'inflammation active de cet organe, alors que les cytokines de type Th2 prédominent dans la circulation lors de la rémission. Ceci souligne l'importance des cytokines dans la pathophysiologie et indique

un changement de profil de cytokines comme une cause ou une conséquence de l'activité autoimmune (69).

Les lymphocytes CD4⁺ sont des cellules auxiliaires « helper » qui activent la différenciation des cellules B en plasmocytes. Des co-cultures de lymphocytes B activés avec des cellules CD4⁺ augmentent dramatiquement la production d'autoanticorps ce qui indique que les CD4⁺ peuvent activer les lymphocytes B autoréactifs (76, 77) (voir FIGURE 6).

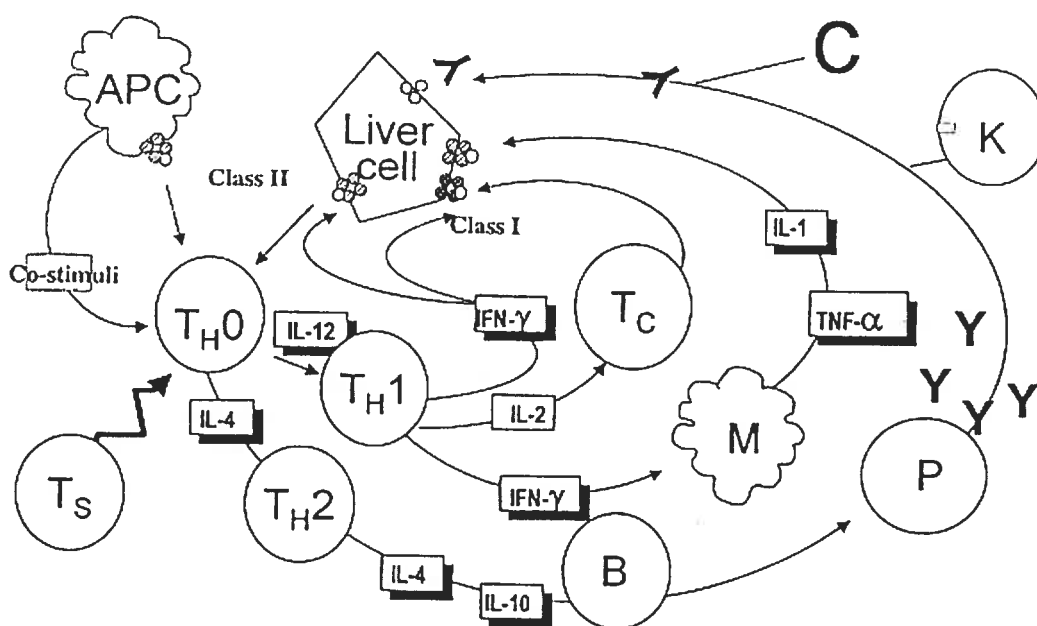


FIGURE 6: L'attaque autoimmune du foie. Un peptide autoantigénique est présenté à une cellule T helper (Th0) sur le CMH de classe II par une cellule présentatrice d'antigène (APC). La cellule T helper s'active et, selon les cytokines présentes dans le milieu, IL-2 ou IL-4, elle se différencie en Th1 ou Th2 et initie une série de réactions immunitaires. Ces réactions sont dépendantes des cytokines relâchées par les Th : les Th2 sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-10 tandis que les Th1 relâchent de l'IL-2 et de INF- γ . Ce dernier stimule les macrophages (M), les cellules T cytotoxiques et augmente l'expression du CMH de classe I par les hépatocytes. Les macrophages activés sécrètent du TNF- α et de l'IL-1. La destruction hépatique peut être aussi médiée par le complément et les cellules NK (K) activés par les autoanticorps.

(Figure tirée Vergani, *Immunology and Liver*, 2000)(74)

Autoanticorps et autoantigènes

Les autoanticorps présents dans le sérum des patients atteints de l'HAI de type II sont considérés comme spécifiques. Les autoantigènes reconnus par les anti-LKM1 et les anti-LC1 sont surtout exprimés dans le foie contrairement aux autoantigènes des anti-SMA et anti-ANA qui caractérisent l'HAI de type I qui sont ubiquitaires. Nous ferons donc un survol des principaux autoanticorps d'intérêt, de leur antigène et de leur signification clinique.

Anti-LKM1 et P450 2D6

Les anticorps anti-LKM1 ont été les premiers autoanticorps décrits comme étant des marqueurs spécifiques de l'hépatite autoimmune de type II (78-80). Ces anticorps furent tout d'abord caractérisés par leur patron d'immunofluorescence indirecte particulier sur des coupes de foie et de rein de rat. La protéine reconnue par ces anticorps est le cytochrome P450 2D6, une enzyme exprimée majoritairement dans le foie mais aussi, en plus faible proportion, dans le rein (23, 81). Le P450 2D6 est une enzyme de la large famille des cytochromes P450. C'est une protéine de 48 000 Da qui se situe dans la membrane du réticulum endoplasmique, exposée du côté du cytoplasme (23). Les anti-LKM1 ont été étudiés de façon extensive et les épitopes majeurs et mineurs sont bien connus (82).

Anti-LC1 et FTCD

La première description des anti-LC1 a été faite en 1988 chez des patients atteints d'une hépatite autoimmune. Chez 7 des 21 patients, les anti-LC1 ont été retrouvés comme seuls marqueurs dans le sérum et n'ont pas été retrouvés chez des patients atteints d'autres pathologies (83). Nous savons que dans 30% des cas d'HAI de type II les anti-LC1 sont associés aux anti-LKM1 et que dans 10% ils sont les seuls marqueurs présents dans le sérum des patients (83). Les anti-LC1 ont attiré l'attention lorsqu'en 1998, une corrélation entre le titre de ces anticorps et le niveau de transaminases dans le sang des patients a été montrée. La présence des anti-LC1 semble indiquer une atteinte hépatique plus grave (84). En 1999, la cible de cet anticorps est identifiée comme la formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD), une enzyme de 62 000 Da exprimée

dans les hépatocytes (85). Les anti-LC1 sont dirigés principalement contre la partie C terminale de FTCD humaine (86, 87). Seulement 40% des anti-LC1 réagissent contre la FTCD de rat lorsqu'elle est sous forme native et toute cette réactivité est perdue lorsque la protéine est dénaturée. La réactivité des anti-LC1 serait donc spécifique à l'espèce (86, 87).

La FTCD est une protéine octamérique (tétramère de dimères) bifonctionnelle liée à l'appareil de Golgi (88, 89). Cette enzyme possède deux domaines, soit le domaine formiminotransférase (FT) et le domaine cyclodésaminase (CD) (90). Elle catalyse deux réactions successives qui couplent la dégradation de l'histidine au métabolisme du folate. Cette protéine forme un octamère qui résulte en une forme de beigne (voir FIGURE 7) (91). Sa structure est liée à sa fonction puisque les réactions catalytiques se produisent aux interfaces des dimères (92). De plus, la protéine forme un canal qui permet au substrat intermédiaire des deux réactions de se diriger vers l'autre site actif (93).

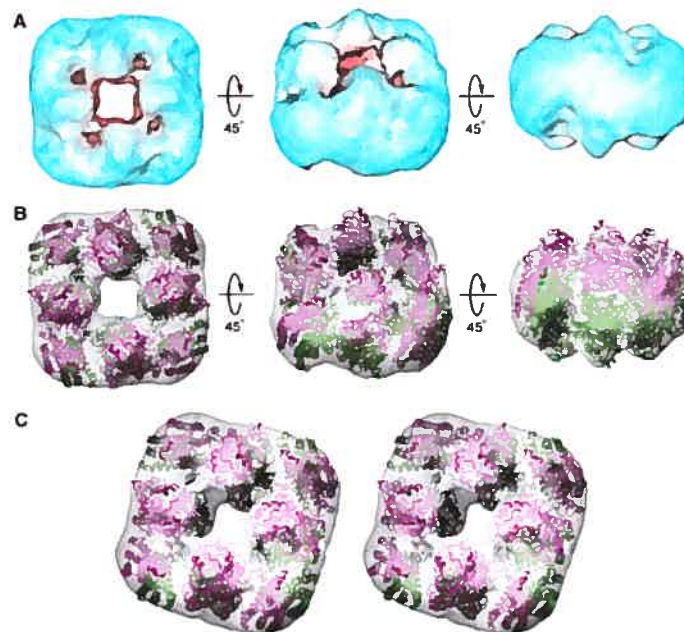


FIGURE 7 : Schéma de la structure octamérique de la formiminotransférase cyclodésaminase. (Figure tirée de Mao et al., *EMBO Journal*, 2004) (91)

Anti-SLA/LP et tRNP^(ser/sec)

Les autoanticorps anti-SLA et anti-liver-pancreas (LP) ont été trouvés par deux groupes indépendants chez des patients atteints de l'hépatite autoimmune. Ces autoanticorps sont dirigés contre une protéine très soluble présente dans le cytoplasme de divers types de cellules (51, 94). Il a été suggéré que les anti-SLA et les anti-LP étaient les mêmes anticorps et dorénavant, on les nomma les anti-SLA/LP (95). Un troisième type d'HAI a même été proposé, caractérisé par la présence d'anti-SLA/LP dans le sérum (51). Toutefois, cette classification a été abandonnée puisqu'il n'y avait pas de signification clinique associée (52). Les anti-SLA/LP ont été retrouvés chez les patients souffrant d'HAI de type I et type II, et ne sont donc pas spécifiques à un type en particulier (53).

L'antigène des anti-SLA/LP est une ribonucléoprotéine associée à l'ARNt suppresseur de l'UGA (tRNP^(ser/sec)), impliquée dans l'incorporation de sélénocystéine dans des enzymes appelées les sélénoprotéines (96). Son incorporation aux protéines requiert une machinerie particulière qui supprime le codon stop (UGA) en présence de sélénium, ce que fait la tRNP^(ser/sec) (97). La découverte de deux variants du même auto-antigène par deux équipes différentes (96, 98) a servi à exclure les autres candidats présumés telles que la cytokératine 8 et 18 ou la glutathione-S-transférase (99, 100). La tRNP^(ser/sec) est exprimée dans le foie, le poumon, les reins, le pancréas et dans les lymphocytes activés (96).

Les autoantigènes tRNP^(ser/sec), la FTCD et le P450 2D6 ne sont pas exprimés sur la membrane plasmique cellulaire, ce qui va contre toute participation des autoanticorps dans le dommage hépatique. De plus, la faible concentration de ces autoantigènes, en comparaison à d'autres protéines exprimées dans les hépatocytes, va à l'encontre de l'hypothèse de la formation de ces autoanticorps due à la seule relâche d'antigènes. Ces autoanticorps, ne sont donc pas considérés comme pathogéniques et, jusqu'à ce jour, leur présence demeure un sujet d'intérêt.

Le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C (VHC) est connu depuis relativement peu de temps. Il fut décrit pour la première fois en 1975 dans des cas d'hépatites post-transfusionnelles après exclusion des virus de l'hépatite A et B, les deux seuls virus responsables d'une hépatite connus à ce moment (101). En 1989, le virus a été cloné et séquencé à partir du sérum d'un patient avec une hépatite non-A non-B (102). Ce ne sera qu'à partir de ce moment qu'un test diagnostique fut établi pour le virus de l'hépatite non-A et non-B, que l'on nomma le virus de l'hépatite C (102, 103).

Le virus de l'hépatite C est le seul représentant des *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Il est de forme sphérique, d'environ 50nm de diamètre, et sa nucléocapside est enveloppée d'une couche lipidique comprenant trois protéines virales : E1, E2 et p7. L'ARN simple brin de ce virus code pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés qui est ensuite clivée en 10 protéines structurelles et non-structurelles (voir FIGURE 8). On identifie quatre protéines structurelles; la « core » qui entre dans la composition de la nucléocapside, E1 et E2, deux glycoprotéines, et p7 qui font partie de l'enveloppe. Six protéines non-structurelles (NS) sont connues : NS2 est impliquée dans la maturation de la polyprotéine, NS3 avec son co-facteur NS4a servent de protéase et NS5b est une polymérase pour l'ARN. Enfin, il y a NS4b et NS5a dont les rôles ne sont pas encore élucidés (104). Une onzième protéine, la protéine F, est produite lorsqu'il survient un changement du cadre de lecture -2/+1; toutefois sa fonction reste encore à déterminer (105). Le mécanisme d'entrée du virus dans les cellules n'est pas encore bien connu. Le récepteur CD81, présent sur les lymphocytes, serait un co-récepteur d'entrée du virus; le récepteur primaire restant inconnu (106). Toutefois, de l'ARN du virus a été trouvé dans les hépatocytes et dans les lymphocytes mononucléaires circulant (107).

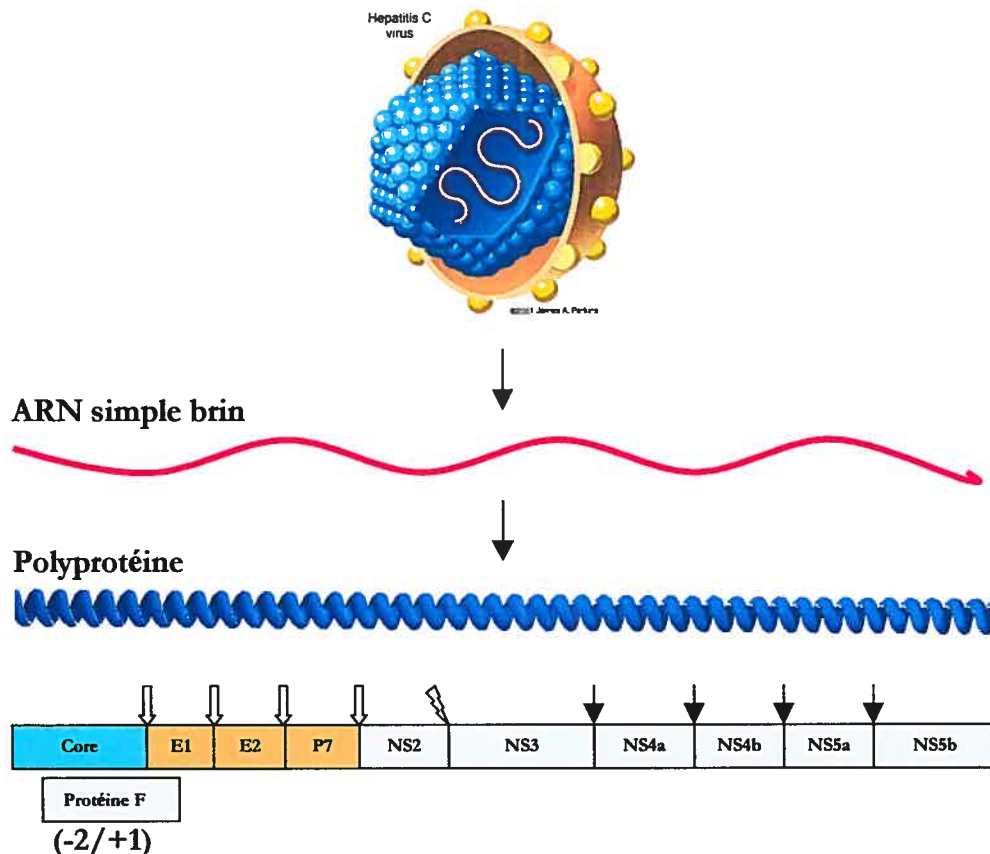


FIGURE 8 : Organisation du génome et de la polyprotéine du virus de l'hépatite C. L'ARN simple brin du virus est traduit en polyprotéine qui est clivée par les protéases de la cellule, par un site d'autoclivage entre NS2 et NS3, qui, une fois libérée clive les autres protéines. De plus, un changement de cadre de lecture -2/+1 entraîne la synthèse de la protéine F.

⚡ : Site de clivage par la cellule ; ⚡ : Site d'autoclivage NS2/NS3 ; ⚡ : Site de clivage par NS3).

Il a été estimé que 170 millions d'individus sont infectés par le virus de l'hépatite C dans le monde (108-110). L'infection n'est pas répartie de façon égale sur le globe. En effet, la prévalence est de 0,1 à 2% dans les pays développés par rapport à 5 à 10% dans les pays en voie de développement. Une exception toute fois frappe : l'Égypte a une prévalence allant jusqu'à 20% de sa population (111). La transmission du virus de l'hépatite C se fait par les contacts avec du sang ou des sécrétions infectés. Suite à une période d'incubation de 4 à 13 semaines, 15% des patients élimineront le virus

spontanément, 85% progresseront vers une hépatite chronique qui, dans 20% évoluera vers une cirrhose et/ou un hépatocarcinome (112). (voir FIGURE 9) Cette infection est la cause majeure de transplantation hépatique dans les pays industrialisés (113).

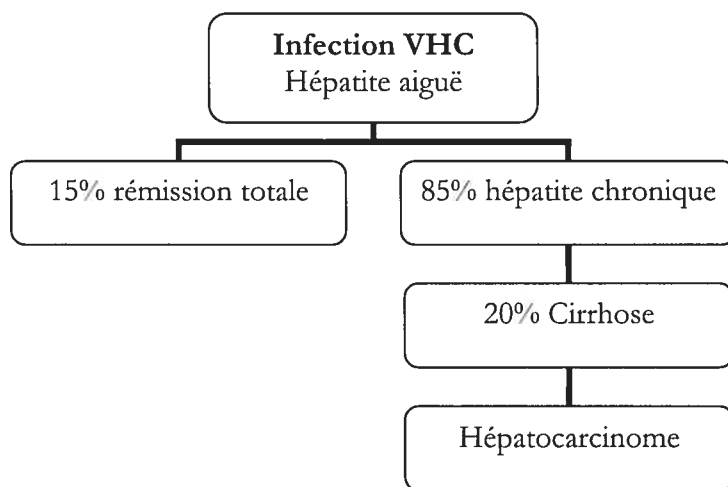


FIGURE 9 : Progression de l'infection par le virus de l'hépatite C selon les individus. 15% des individus infectés élimineront le virus alors que 85% progresseront vers une hépatite chronique qui se développera en cirrhose chez 20% de ces patients.(112)

Les meilleurs résultats dans le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C ont été obtenus par l'administration d'interféron- α et de ribavirine. À ce jour, il n'existe pas de vaccin efficace contre le VHC.

VHC et autoimmunité

L'infection par le virus de l'hépatite C est associée à plusieurs manifestations autoimmunes. Ces phénomènes autoimmuns peuvent être systémiques et non spécifiques, telle que la cryoglobulinémie mixte qui est définie comme une grande concentration d'anticorps dans le sérum qui précipitent lorsque ce dernier est refroidi (114). Il existerait d'ailleurs une corrélation entre les mutations dans la région hypervariable du virus et la présence d'une cryoglobulinémie mixte chez les patients. En

effet, la liaison de la région hypervariable de la protéine E2 par le lymphocyte B entraînerait une lymphoprolifération de celui-ci, une cause probable de la grande quantité d'anticorps observée dans le sérum (115, 116). D'autres part, des atteintes plus spécifiques ont été décrites telle que l'apparition d'une thyroïdite autoimmune, d'une arthrite rhumatoïde ou encore d'une glomérulonéphrite (114).

L'apparition d'autoanticorps plus spécifiques a aussi été décrite dans l'infection chronique au virus de l'hépatite C (35). En effet, plusieurs autoanticorps ont été décrits avec différentes prévalences selon les groupes. Des anticorps anti-noyau (ANA) sont présent dans 9 à 38% des cas, des anticorps anti-muscles lisses (SMA) dans 5 à 91% des cas et des anticorps anti-thyroïdiens dans 9 à 20% des cas (35). Toutefois, ce qui retient plus notre attention c'est que des anti-LKM1, marqueurs spécifiques de l'hépatite autoimmune de type II, ont été retrouvés chez environ 5% des patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C (50, 117).

La découverte d'un marqueur d'autoimmunité spécifique et commun entre le VHC et l'HAI est survenue en 1990 alors que des anticorps anti-VHC ont été retrouvés dans les sérums de patients ayant des anti-LKM1 (36). Les anti-LKM1 dans l'hépatite autoimmune de type II et ceux retrouvés dans l'infection au VHC présentent des différences au niveau de leur réactivité contre le P450 2D6. Dans l'HAI de type II, tous les patients LKM1+ reconnaissent le P450 2D6 sous sa forme dénaturée, ce qui suggère qu'ils ont tous des anticorps qui réagissent contre des épitopes linéaires de la protéine. Toutefois, ce n'est pas le cas dans le VHC puisque seulement 30% des patients ont des autoanticorps qui reconnaissent la protéine dénaturée (38). De plus, l'épitope majeur reconnu par les anti-LKM1 est différent dans les deux maladies. La portion entre les acides aminés (a.a.) 254 à 271 est le déterminant majeur dans l'HAI de type II alors que la portion entre les a.a. 321 à 339 du P450 2D6 est majoritairement reconnue par les anti-LKM1 chez les patients infectés par le VHC (37, 38, 118).

Des études ont été faites afin de trouver une explication pour la présence des anti-LKM1 dans le sérum des patients infectés par le VHC. L'existence d'un mimétisme moléculaire

entre les protéines du virus et le P450 2D6 a été proposée. Un mimétisme conformationnel a été suggéré entre la portion a.a. 1875-1890 de la polyprotéine du VHC (NS4b) et les acides aminés 311 à 326 du P450 2D6, mais cette théorie n'a jamais été confirmée de façon expérimentale (119). D'autre part, un mimétisme moléculaire a été trouvé au niveau de la reconnaissance par les lymphocytes T entre la protéine « core » de VHC (a.a. 178-187) et le P450 2A7 (a.a. 8-17) (120).

Hypothèse

Puisque les anti-LKM1 sont des autoanticorps spécifiques à l'hépatite autoimmune et qu'ils ne sont pas trouvés dans d'autres pathologies, mise à part l'hépatite C, nous proposons que d'autres autoanticorps spécifiques à l'HAI peuvent aussi être présents dans le sérum des patients infectés de façon chronique par l'hépatite C. Notre hypothèse est donc que des autoanticorps anti-LC1 et anti-SLA/LP pourraient être développés chez les patients infectés de façon chronique par le VHC. En se basant sur les connaissances que nous avons sur les anti-LKM1 dans l'hépatite C nous avons testé la présence des anti-LC1 et des anti-SLA/LP en utilisant des méthodes sensibles et non-dénaturantes. Le but de la présente étude est donc de déterminer la prévalence de ces autoanticorps dans une population infectée chroniquement par le VHC et de les caractériser.

Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection

Kathie Béland, Pascal Lapierre, Gabriel Marceau, Fernando Alvarez*

Service de Gastroentérologie et Nutrition, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5

Received 22 August 2003; revised 20 October 2003; accepted 10 November 2003

Abstract

Various autoantibodies have been reported in patients chronically infected by hepatitis C virus. 2% to 10% of these patients have anti-liver–kidney microsome type 1 (anti-LKM1) autoantibodies. In type 2 autoimmune hepatitis, anti-LKM1 autoantibodies are frequently associated with anti-liver–cytosol type 1 (anti-LC1) autoantibodies. *Aims:* To determine the prevalence of anti-LC1 autoantibodies in a hepatitis C-positive population and characterize their reactivity. *Methods:* 146 patients suffering from liver diseases, of which 99 were chronically infected by hepatitis C virus, were tested by Western blotting and immunoprecipitation to detect and characterize anti-LC1 autoantibodies. *Results:* 12% of this hepatitis C population had anti-LC1 autoantibodies. LC1 positivity by Western blotting was 30% of LC1+ sera. Epitopes were found throughout the protein but linear epitopes were situated in the 395–541 amino acid region of formiminotransferase cyclodeaminase. Three putative conformational epitopes were identified by phage display. *Conclusions:* Anti-LC1 autoantibodies are as prevalent as anti-LKM1 autoantibodies in patients infected with hepatitis C virus and their production is not dependent of anti-LKM1 autoantibodies formation. Autoantibody reactivity against the anti-LC1 antigen is different in hepatitis C than in type 2 autoimmune hepatitis. Anti-LC1 autoantibodies can now be regarded as a serological marker of autoimmunity in chronic hepatitis C infection.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anti-LC1 autoantibodies; Autoantibodies; Autoimmune hepatitis; Formiminotransferase cyclodeaminase; Hepatitis C virus

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a member of the *Flaviviridae* family responsible for acute and chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. It is the most frequent cause of chronic hepatitis and liver transplantation in adults. Various immunological abnormalities, such as the presence of autoantibodies, have been described in chronically infected hepatitis C patients [1,2]. One of these autoantibodies has been identified as anti-liver–kidney microsome type 1 autoantibody (anti-LKM1), thought to be specific for type 2 autoimmune hepatitis (AIH). Anti-LKM1 autoantibodies are found in 2% to

10% of patients with chronic HCV infection [3,4]. These autoantibodies in HCV are directed against cytochrome P450IID6 (CYP2D6), a liver-specific enzyme, but show some differences in reactivity from those detected in type 2 AIH [2]. In fact, whereas all anti-LKM1 autoantibodies in type 2 AIH recognize the denatured form of CYP2D6, only 30% of anti-LKM1 autoantibodies in chronic HCV do so. The two groups also recognize different antigenic determinants on the CYP2D6 molecule [2,5–7].

In type 2 AIH, anti-LKM1 autoantibodies are associated with the presence of anti-liver–cytosol type 1 (anti-LC1) autoantibodies in 30% of patients. In 10% of type 2 AIH, anti-LC1 are the only liver-related autoantibodies in the circulation [8]. These autoantibodies are not pathogenic but anti-LC1 concentration in AIH patient sera are correlated with transaminase levels, and, therefore, with liver inflammatory activity [9]. These autoantibodies recognize human formiminotransferase cyclodeaminase (hFTCD), a 62 kD intracellular enzyme

* Corresponding author. Tel.: +1-514-345-4626; fax: +1-514-345-4999.

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; anti-LKM1, anti liver–kidney microsome type 1; AIH, autoimmune hepatitis; CYP2D6, cytochrome P450IID6; anti-LC1, anti liver–cytosol type 1; hFTCD, human formiminotransferase cyclodeaminase; aa, amino acid

found in the cytosol of hepatocytes [10]. Few studies have been carried out on the presence of anti-LC1 autoantibodies in chronic HCV infections. In 1994, Codoñer-Franch et al. [11] detected a 58-kD signal by Western blot on rat liver cytosol in 1 out of 229 HCV patients. In 1995, Lenzi et al. [12] found, by immunodiffusion with liver cytosol, anti-HCV antibodies in 13 of 25 anti-LC1+ patients. The aims of our study were to determine the relative frequency of anti-LC1 autoantibodies in the HCV-positive population using a specific human antigen, and to further characterize their reactivity by epitope mapping. These findings could help us to elucidate the mechanism behind the occurrence of such autoantibodies in both chronic hepatitis C infection and type 2 AIH.

2. Materials and methods

2.1. Patients and sera

Sera from 146 patients suffering from various liver diseases were tested by immunoprecipitation and Western blotting to detect the presence of anti-LC1 and anti-LKM1 autoantibodies. Fifty-eight of these 146 patients were HCV+/LKM1+, 41 were HCV+/LKM1–, 22 were type 1 AIH (all patients fulfill the criteria for AIH defined by the *International Autoimmune Hepatitis Group*) [13] and 25 had chronic liver diseases unrelated to AIH or HCV infection. The latter two groups were used as negative controls. Sera from healthy individuals were also used as negative controls. All sera were from an anonymous group composed of both pediatric and adult patients. Anti-LKM1 autoantibodies were detected by immunofluorescence, immunoprecipitation and Western blotting against human liver microsomal fraction. HCV infection was diagnosed by second-generation RIBA and/or PCR.

2.2. Western blot analysis

30 µg of human liver cytosolic fraction, 30 µg of human liver microsomal fraction or 0.8 µg of purified LCHC1 protein [10] were separated on 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Life Sciences, Oakville, Canada). The membranes were blocked in 5% powdered milk in TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) for 2 h. Then, they were incubated in 1% powdered milk-TBST containing patient sera at a dilution of 1:1000 for 2 h at room temperature. Next, the membranes were washed and incubated with the secondary antibody, anti-human IgG-horseradish peroxidase (Biosource International, Camarillo, CA, USA), at 1:10,000 in TBST/1% powdered milk for 1 h at room temperature. Bound peroxidase was detected with

chemiluminescence blotting substrate (Boehringer Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Proteins and cDNA constructions

In subsequent *in vitro* transcription/translation experiments, human formiminotransferase cyclodeaminase (hFTCD) cDNA (Genbank accession number NM 006657) (kindly given by Dr de la Luna, Hospitalet de Llobregat, Spain) [14] was cloned in pCR II-TOPO. The 4 FTCD constructs used, C1: amino acid (aa) 1–363, C2: aa 1–298, C3: aa 1–222 and C4: aa 1–178, were obtained by PCR amplification [15]. Because of the subcloning procedures and the coupled transcription/translation method employed, the different recombinant proteins showed the following molecular weights: 43 kD for 1–363, 45 kD for 1–298, 32 kD for 1–222, and 24 kD for 1–178. The full-length cDNA sequence of human CYP2D6 cloned into the *EcoRI* site of pGEM3 was a gift from Urs A. Meyer, Basel University (Basel, Switzerland).

For Western blot analysis and ELISA, LCHC1 (hFTCD peptide between aa 395 to 541) was cloned in pMAL-cR1 as described [10]. Complete hFTCD was also cloned in pGEX4T3. These two constructs were used to prokaryotically express the complete and truncated (aa 395–541) form of hFTCD.

2.4. *In vitro* coupled transcription/translation

The *in vitro* transcription/translation of full length and truncated hFTCD [15] and CYP2D6 was performed with TnT-coupled reticulocyte lysate systems (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's guidelines. Proteins were radiolabeled with S³⁵ methionine (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). Radioactivity incorporation was measured after trichloroacetic precipitation.

2.5. Immunoprecipitation

All the sera described above were used to immunoprecipitate S³⁵ labeled hFTCD, hFTCD constructs (aa 1–363, 1–298, 1–222, 1–178) and CYP2D6, as described [16]. About 50,000 cpm of radiolabeled proteins were incubated with human serum in NET buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.25% gelatin) at 4 °C for 2 h. Then, protein A sepharose (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Canada) was added, and the mix was incubated at 4 °C for 1 h. The sepharose was pelleted and washed 6 times with RIPA buffer (1% NP-40, 1% DOC, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4). Each immunoprecipitation was duplicated with positive and negative control sera. Immunoprecipitations were resuspended in

Table 1

Reactivity of HCV+ and control sera against type 2 AIH autoantigens. The results of AIH type 2 hepatitis autoantigens detection in HCV+ patient sera by Western blotting and immunoprecipitation are summarized. Sera from type 1 AIH patients and other non-related liver disease-affected patients were used as controls and were found to be negative with all techniques

	Western blot		Immunoprecipitation	
	Human liver microsomal fraction	Human liver cytosol fraction	CYP2D6	hFTCD
HCV+/LKM1+ (n=58)	14 (24%)	2 (4%)	58 (100%)	6 (10%)
HCV+/LKM1- (n=41)	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	6 (15%)
Type 1 AIH (n=22)	-	0 (0%)	-	0 (0%)
Unrelated liver diseases (n=25)	-	0 (0%)	-	0 (0%)

gel loading buffer (0.12 M Tris-HCl, 4% SDS, 0.001% bromophenol blue, 2% β -mercaptoethanol, 20% glycerol), subjected to 10% SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), and revealed by fluorography.

2.6. ELISA

ELISA was used to detect the presence of anti-LC1 autoantibodies reacting against the aa 396–541 peptide of hFTCD (LCHC1) in sera found to be anti-LC1-positive by immunoprecipitation. Microwell ELISA plates (Corning, New York, NY, USA) were coated overnight at 4 °C with 0.2 μ g of LCHC1 in 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6). The plates were then washed and incubated with 200 μ l of blocking solution (5 mg/ml bovine sera albumin, 0.1 M NaHCO₃ pH 8.6) at 37 °C for 1 h. After six washes with TBST-5% BSA, they were incubated with patient sera at 1:100 to 1:800 for 1 h 30 min at 37 °C. The plates were again washed six times and then incubated with alkaline-phosphatase-conjugated anti-human IgG (1:10,000) in TBST-5% BSA at room temperature for 1 h. They were rewashed six times and revealed by the addition of 100 μ l of a *p*-nitrophenyl phosphate solution (0.05 M Na₂CO₃ pH 9.8, 0.001 M MgCl₂, 1 mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, USA)). After 30 min at room temperature, absorbance was measured at 405 nm with a microtitre plate reader. Each ELISA was performed with negative and positive control sera. The results were considered positive when the absorbance reading was twice the mean value of negative control sera for each dilution.

2.7. hFTCD peptide array

An array of 57 contiguous peptides was synthesized on a polyvinylidene difluoride membrane (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The decapeptide ranged from aa 412 to 468 of hFTCD, and overlapped by 9 aa. The peptide array membrane was incubated and revealed as described above (Western blot analysis). Sera from 2 HCV+/LC1+ patients previously found to have auto-

antibodies against LCHC1 (hFTCD aa 395–541) by ELISA and Western blot analysis were tested.

2.8. Phage display

The Ph.D.-7 phage display peptide library from New England Biolabs (Beverly, MA, USA) was used to detect linear and conformational epitopes [17,18]. The library is composed of M13 phages coding for approximately 1.28×10^9 random 7 aa residues. The displayed heptapeptides were expressed at the N-terminus of the minor coat protein pIII of the filamentous coliphage M13. This library was screened employing 100 μ l of HCV+/LC1+ patient sera according to the manufacturer's guidelines.

2.9. Computer analysis

The clones obtained by phage display were sequenced and compared to the hFTCD aa sequence using the BLAST 2 sequences program from the National Center for Biotechnology Information [19]. The structure model of human FTCD was made using Swiss Model [20,21], with the crystal structure of pig FTCD (accession number. 1QD1) serving as a template [22]. The model's validity was confirmed with WHAT_CHECK [23]. Protein structure was analyzed with the Swiss PDB Viewer 3.7 program, and the final images were rendered with POVRAY version 3.0.

3. Results

3.1. Analysis of autoantibodies in HCV+ patient

Each HCV+ serum sample had been previously characterized by immunofluorescence for anti-LKM1 autoantibodies, and the results confirmed by immunoprecipitation with radiolabeled CYP2D6. These sera were also tested by Western blotting against human liver microsomal fraction, and 24% of HCV+/LKM1+ sera were found to be positive against the denatured form of CYP2D6 (Table 1). For further analysis, the HCV+

population was divided in 2 groups: LKM1+ and LKM1-.

All 146 sera were tested by Western blotting against human liver cytosol fraction and by immunoprecipitation with radiolabeled hFTCD to search for anti-LC1 autoantibodies. When analyzed by Western blotting, 2 (4%) of the 58 HCV+/LKM1+ and 2 (5%) of the 41 HCV+/LKM1- patient sera recognized a 62-kD protein corresponding to human FTCD (Table 1). By immunoprecipitation of radiolabeled hFTCD, 6 of the 58 HCV+/LKM1+ and 6 of the 41 HCV+/LKM1- sera recognized the protein. All sera positive by Western blotting remained positive when tested by immunoprecipitation. As for LKM1 autoantibodies, LC1 positivity by Western blotting was around 30% of the total HCV+/LC1+ sera [2,5]. Altogether, these results disclosed that 10% of HCV+/LKM1+ sera and 15% of HCV+/LKM1- sera tested also showed anti-LC1 autoantibodies (Table 1).

3.2. Linear epitope mapping

3.2.1. LCHC1 cDNA constructs tested by Western blotting and ELISA

In type 2 AIH, all patient sera recognized linear epitopes within the aa 395–541 region of hFTCD [10]. On this basis, all HCV+/LC1+ patient sera (as determined by immunoprecipitation) were tested against LCHC1 (hFTCD aa 395–541) and hFTCD recombinant protein by Western blotting and ELISA. Twenty-five percent of the LC1+ sera tested were reactive against denatured hFTCD by Western blotting. When LCHC1 was used, 25% of reactivity was found by Western blotting and 33% by ELISA. This small difference of reactivity was due to the fact that not all sera reacting against hFTCD could be tested against LCHC1 either by Western blotting or ELISA. When only the sera used for all three experiments (hFTCD Western blotting, LCHC1 Western blotting, LCHC1 ELISA) were taken into account, there was a 100% concordance of the results (Table 2).

3.2.2. Peptide array

A region of high antigenicity lies within the peptide of aa 395–541 (LCHC1 subclone), as predicted by computer analysis. This region, from aa 412 to 468, was used as a template to synthesize a peptide array of 48 overlapping decamers. Two of the HCV+/LC1+ sera (positive by Western blotting) were further investigated with the peptide array. Both sera recognized the LQEGLRRA aa sequence which corresponded to aa 440 to 447 in hFTCD. One of the sera also recognized the RLPKNTPE (aa 424 to 431 in hFTCD) and PLT-LAETV (aa 451 to 458 in hFTCD) aa sequences.

Table 2

Reactivity of anti-LC1 autoantibodies in HCV+/LC1+ patient sera with hFTCD and constructs. Different epitope mapping techniques were employed to identify linear and conformational epitopes. Sera were tested against full-length human FTCD, LCHC1 (aa 395–541 of FTCD) and FTCD constructs C1, C2, C3 and C4. Percentages indicate the proportion of HCV+/LC1+ sera that bind to the peptide by different techniques

Antigens	Immunoprecipitation	Western blot	ELISA
HFTCD (n=12)	100%	25% ^a	
C1 (n=11)	90%		
C2 (n=11)	90%		
C3 (n=11)	73%		
C4 (n=11)	73%		
LCHC1 (n=8, n=9)		25% ^a	33% ^a

^a Not all the sera tested against hFTCD could be tested against LCHC1, but for those that were tested, 100% concordance was found.

3.3. Conformational epitope mapping

3.3.1. hFTCD cDNA constructs tested by immunoprecipitation

Sera positive for anti-LC1 autoantibodies were further investigated by epitope mapping with different FTCD cDNA constructs (Fig. 1c). First, radiolabeled FTCD cDNA constructs C1 to C4 were immunoprecipitated with 11 HCV+/LC1+ sera. Most (90%) of the sera tested were positive for C1, the longer cDNA construct (aa 1–363); 90% of the sera also bound C2 (aa 1–298), and 73% reacted with both C3 (aa 1–222) and C4 (aa 1–178) (Fig. 1 and Table 2). Therefore, for 10% of patients, the antigenic determinant was located between aa 363 and aa 541. For 17% of patients it was located in the aa 222–541 portion of hFTCD. For the majority (73%) of HCV+/LC1+ patients, conformational epitopes were comprised in the 1–178 aa region and possibly distributed throughout the human FTCD protein.

3.3.2. Phage display

As described before [17,18], the phage display array can detect both linear and conformational epitopes; therefore, this technique was chosen to detect these epitopes in LC1+/HCV+ patients. Five different clones were found with the phage display array. These mimotopes were SSSLFLQ, APRRQLP, HQTNTKS, QPQTAWS and SGSIPSG. We compared these peptide sequences to the hFTCD sequence, and several alignments were made. First, SSSLFLQ was similar to SSSL, the aa 519–522 region of hFTCD, a known antigenic region. For the APRRQLP mimotope, it was similar to the aa 130–139 in hFTCD. When the mimotope was superimposed on the hFTCD molecule, it was found that the glutamine 155 and the proline 160 of hFTCD were on the surface and within a 10 Å radius of the aa

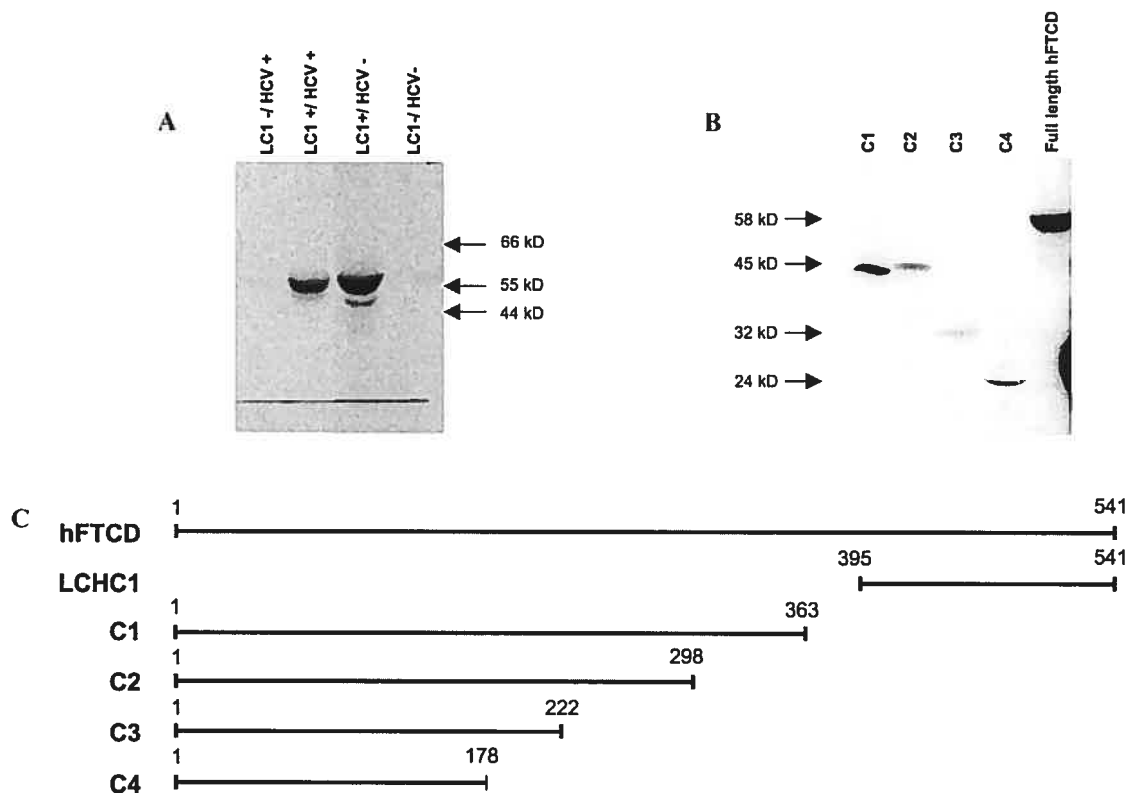


Fig. 1. Epitope mapping of anti-LC1 autoantibodies in HCV+ patients. (A) Immunoprecipitation of hFTCD with HCV+ patient and control sera. (B) Immunoprecipitation of full length and truncated hFTCD with HCV+/LC1+ patient sera. (C) cDNA constructs of hFTCD used for epitope mapping of anti-LC1 autoantibodies in HCV+ patient sera.

130–139 region, and could be part of a conformational epitope, thus completing the mimotope (Fig. 2A). The QPQTAWs and SGSIPSG mimotopes were similar respectively to aa 150 to 164 and aa 164 to 171 in hFTCD (Fig. 2B).

4. Discussion

This study shows that anti-LC1 autoantibodies can be present in the sera of chronically infected HCV patients. These autoantibodies are not detected in the sera of healthy individuals or patients suffering from unrelated liver diseases (Table 1). Anti-LC1 autoantibodies are specific for type 2 AIH and HCV infection, and they are not only the result of liver parenchyma injury [8,10]. In our population of chronically HCV-infected patients, 12% had anti-LC1 autoantibodies in their sera directed against the non-denatured form of hFTCD (Table 1). The prevalence of anti-LC1 autoantibodies in HCV+ sera was not different between the LKM1+ and the LKM1- groups. This observation suggests that anti-LC1 autoantibody production in chronically infected HCV patients is independent of the formation of anti-LKM1 autoantibodies.

Difference observed in the reactivity of anti-LC1 autoantibodies depend upon the methods used. Thirty percent of these patients had developed anti-LC1 autoantibodies recognizing the denatured form of hFTCD by Western blotting (Table 1). This is different from what was previously observed in type 2 AIH, where 100% of LC1+ patients suffering from this disease had anti-LC1 autoantibodies reacting against the denatured form of hFTCD [10]. This finding is similar to what has been reported with anti-LKM1 in HCV, since only about 30% of HCV+/LKM1+ patient sera recognized the denatured form of CYP2D6 [2,5] (Table 1). Altogether, these and previous results show that patients with chronic HCV infection may develop a polyclonal autoantibody response against the same autoantigens as in type 2 AIH, but in HCV, those autoantibodies react exclusively, in 70% of cases, against conformational epitopes on the self-antigen.

Codoñer-Franch et al. [11] found anti-LC1 autoantibodies in 1 out of 229 HCV patients by Western blotting on rat liver cytosol. Lenzi et al. [12] discovered later that only 68% of anti-LC1 autoantibodies in HCV recognize the rat protein compared to the human FTCD. These findings clearly show that human native antigens are

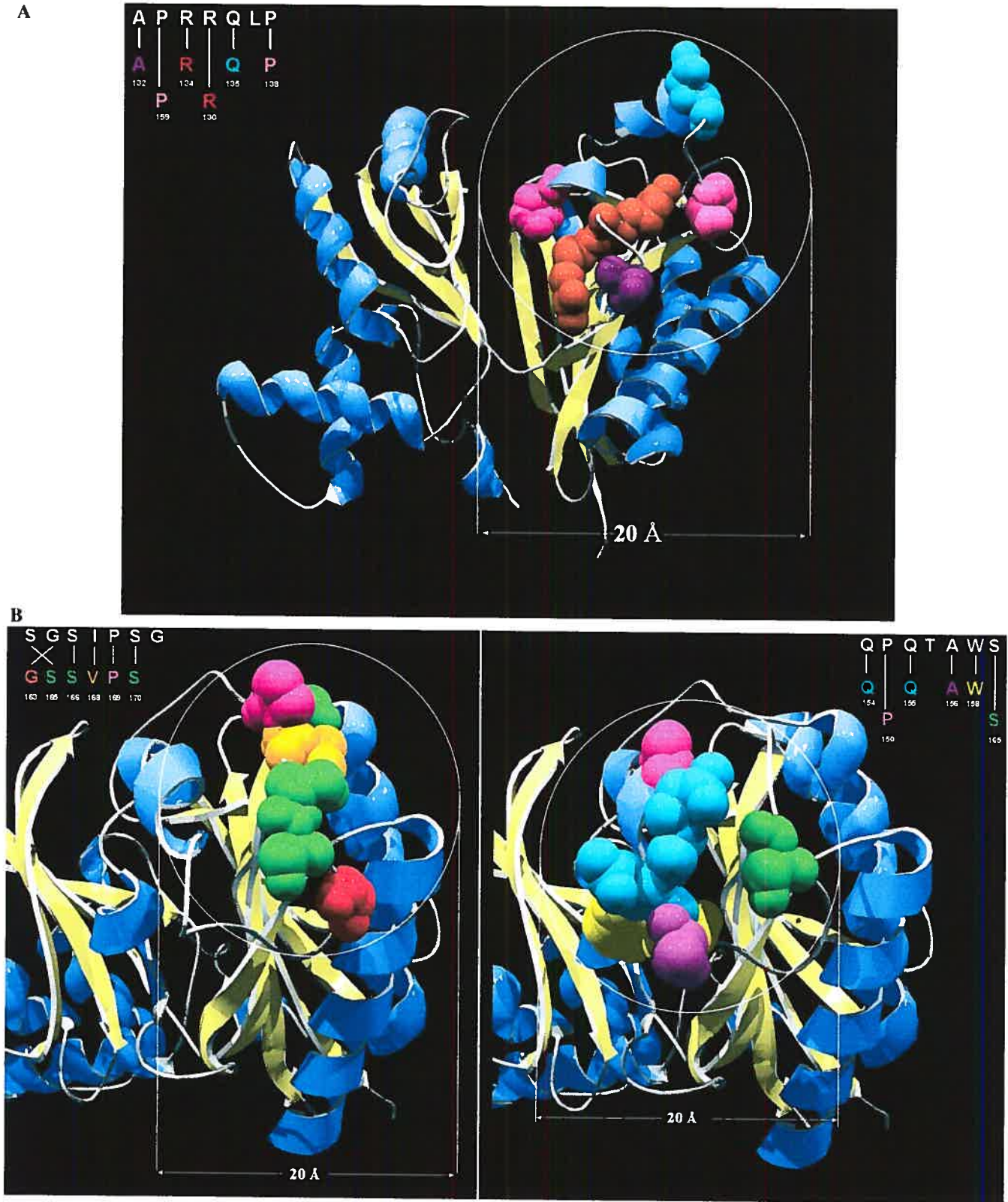


Fig. 2. Structural analysis of the proposed epitopes identified by phage display. The peptides identified as possible epitope have been compared to the aa sequence of hFTCD (peptide sequence in white, hFTCD sequence in color). These putative epitopes have also been superimposed on the tertiary structure of the hFTCD protein. (A) APRRQLP, and (B) QPQTAW S and SGSIPSG were found to fit in the same region of hFTCD (aa 150–171).

needed to detect anti-LC1 autoantibodies in HCV-infected patients.

An interesting fact is that all patients who reacted against the denatured form of hFTCD also reacted against the LCHC1 (aa 395–541 of hFTCD) peptide in Western blotting and ELISA (Table 2). These findings suggest that a linear antigenic determinant recognized by anti-LC1 autoantibodies in HCV, is located in the C-terminal part of hFTCD (aa 395–541). The same observation was made in type 2 AIH as all anti-LC1-positive sera recognize a linear epitope in this region [10]. To identify the shorter sequence recognized by anti-LC1+ sera, a peptide array was synthesized and tested. This peptide array covers the aa 412 to 468 region of hFTCD that was considered highly immunogenic by computer analysis. Three different peptides were recognized by anti-LC1 autoantibodies from HCV-positive sera. The LQEGLRRA peptide was also recognized by anti-LC1 autoantibodies in type 2 AIH patients with the same method [15].

Since 70% of HCV+/LC1+ patient recognized only the native protein, the next logical step was to further define the conformational epitopes of hFTCD. The cDNA constructs of hFTCD tested by immunoprecipitation showed that, for the majority of patients, anti-LC1 conformational epitopes were distributed throughout the hFTCD protein (Table 2). As described for type 2 AIH, multiple peptide regions of hFTCD can trigger anti-LC1 autoantibodies that mostly have conformational epitopes [15,24]. The observations that anti-LC1 autoantibodies in AIH and chronic HCV infection are polyclonal and directed against conformational and linear epitopes lead us to the conclusion that these autoantibodies are the consequence of an antigen-driven response in both pathologies. The formation of anti-LC1 autoantibodies might be triggered by an epitope-spreading phenomenon, where the development of a single epitope initiates and expands an autoimmune response against the whole molecule [25].

As described before [17,18], the phage display array can detect both linear and conformational epitopes and therefore, this technique was chosen to test LC1+/HCV+ patient sera recognizing the hFTCD protein (Table 2). Five identified mimotopes were aligned with the aa sequence of hFTCD. No perfect match was found, but similarities were identified for all mimotopes (data not shown). Three peptides presented similarities with the forminotransferase portion of the hFTCD protein. This region was the only one that had its structure elucidated by crystallography [22], allowing us to superimpose the tertiary structure of hFTCD with alignments previously made. The APRRQLP mimotope was similar to aa 130–139 in hFTCD. A glutamine and a proline were missing from this region to complete the mimotope. The missing glutamine and proline were found at aa positions 155 and 160 of hFTCD within a

radius of 10 Å and exposed to the surface, thus recreating the mimotope (Fig. 2A) [17]. The QPQTAWS and SGSIPSG mimotopes were similar, respectively to aa 150 to 164 and aa 164 to 171 in hFTCD (Fig. 2B). The aa 150–171 region is a coil and is exposed at the surface; these characteristics allow us to speculate that the aa 150–171 region is an immunogenic site of hFTCD. Since all HCV+/LC1+ patient sera recognized those peptides by dot blot (data not shown), the putative epitopes could be conformational antigenic determinants for anti-LC1 in the HCV population. Another mimotope displayed similarities with to cyclodeaminase portion of hFTCD. The SSSLFLQ mimotope was similar to SSSL, the aa 519–522 region of hFTCD. This is interesting since, in type 2 AIH, a linear discontinuous epitope was found in the region in which SSSL aa are essential for reactivity of the autoantibodies [15].

The development of LKM1 autoantibodies in HCV+ patients has always been an intriguing fact as they are considered to be specific for type 2 AIH. Our observation that anti-LC1 autoantibodies are as common as anti-LKM1 autoantibodies in the HCV-positive population emphasizes the importance of anti-LC1 autoantibodies in chronic infection. Since the same autoantibodies are found in AIH and HCV-infected patients, it can be speculated that the autoimmune phenomena in both diseases share some common basis. In type 2 AIH, the concentration of anti-LC1 in sera correlates with the progression of the disease indicating that anti-LC1 could play a role in the pathogenesis of AIH [9]. Further studies must be done to investigate this correlation in chronically infected HCV patient to determine if these autoantibodies mediate liver damage.

The process by which these autoantibodies are formed is unknown, but several hypotheses can be stated: an immunological response against proteins released after hepatocyte injury can occur, or molecular mimicry could develop between the self-protein and HCV antigens. The latter hypothesis was studied recently by Kerkar et al. [26] who reported cross-reactivity of anti-LKM1 autoantibodies between CYP2D6, NS5 protein of HCV and cytomegalovirus-UL98 in chronically infected HCV patients. HCV infection could also be an immune modulator in a particular environment and genetic background that generates an aberrant immunological response against a self-protein, leading to autoantibody production. Further studies are needed to clarify the pathogenesis of B-cell autoimmunity in this disease and using available clinical parameters, the time-course and progression of the disease in LC1 positive patient warrants further investigation. When investigating autoimmunity in chronic hepatitis C infection, the anti-LC1 serological marker should be tested since it could be relevant in the diagnosis and treatment of this pathology.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant EOP-41539) and the Canadian Liver Foundation.

References

- [1] Czaja AJ, Magrin S, Fabiano C, Fiorentino G, Diquattro O, Craxi A et al. Hepatitis C virus infection as a determinant of behavior in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40:33–40.
- [2] Yamamoto AM, Cresteil D, Homberg JC, Alvarez F. Characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM1) from hepatitis C virus-positive and -negative sera. *Gastroenterology* 1993;104:1762–7.
- [3] Lunel F, Abuaf N, Frangeul L, Gripon P, Perrin M, Le Coz Y et al. Liver/kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992;16:630–6.
- [4] Bortolotti F, Vajro P, Balli F, Giacchino R, Crivellaro C, Barbera C et al. Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996;25:614–20.
- [5] Yamamoto AM, Johanet C, Duclos-Vallee JC, Bustarret FA, Alvarez F, Homberg JC et al. A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type-2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:396–400.
- [6] Ma Y, Thomas MG, Okamoto M, Bogdanos DP, Nagl S, Kerker N et al. Key residues of a major cytochrome P4502D6 epitope are located on the surface of the molecule. *J Immunol* 2002;169:277–85.
- [7] Herzog D, Yamamoto AM, Jara P, Maggiore G, Sarles J, Alvarez F. Sera of children with hepatitis C infection and anti-liver-kidney microsome-1 antibodies recognize different CYP2D6 epitopes than adults with LKM+/HCV+ sera. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:551–5.
- [8] Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988;8:1662–6.
- [9] Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998;42:721–6.
- [10] Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:643–9.
- [11] Codoner-Franch P, Ordinana V, Gasco E, Villalba J, Alvarez F. Anti-rat liver microsomal and cytosolic antibodies in hepatitis C virus infection. *Autoimmunity* 1994;17:89–97.
- [12] Lenzi M, Manotti P, Muratori L, Cataleta M, Ballardini G, Cassani F et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995; 36:749–54.
- [13] Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929–38.
- [14] Solans A, Estivill X, de la Luna S. Cloning and characterization of human FTCD on 21q223, a candidate gene for glutamate formiminotransferase deficiency. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88:43–9.
- [15] Lapierre P, Johanet C, Alvarez F. Characterization of the B cell response of patients with anti-liver cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis. *Eur J Immunol* 2003;33:1869–78.
- [16] Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. Cells: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998;72.1–4.
- [17] Rowley MJ, Scealy M, Whisstock JC, Jois JA, Wijeyewickrema LC, Mackay IR. Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display. *J Immunol* 2000;164:3413–9.
- [18] Osman AA, Uhlig H, Thamm B, Schneider-Mergener J, Mothes T. Use of the phage display technique for detection of epitopes recognized by polyclonal rabbit gliadin antibodies. *FEBS Lett* 1998;433:103–7.
- [19] Tatusova TA, Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1999;174:247–50.
- [20] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714–23.
- [21] Peitsch MC. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* 1996;24:274–9.
- [22] Kohls D, Sulea T, Purisima EO, MacKenzie RE, Vrielink A. The crystal structure of the formiminotransferase domain of formiminotransferase-cyclodeaminase: implications for substrate channeling in a bifunctional enzyme. *Structure Fold Des* 2000; 8:35–46.
- [23] Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE. Errors in protein structures. *Nature* 1996;381:272.
- [24] Muratori L, Sztul E, Muratori P, Gao Y, Ripalti A, Ponti C et al. Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. *Hepatology* 2001; 34:494–501.
- [25] Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 1996;8:831–6.
- [26] Kerker N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L et al. Cytochrome P4502D6(193–212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003;170:1481–9.

Anti-Soluble Liver Antigen (SLA) Antibodies in Chronic HCV Infection

SUSANA VITTOZZI, PASCAL LAPIERRE, IDRIS DJILALI-SAIAH, GABRIEL MARCEAU, KATHIE BELAND and FERNANDO ALVAREZ*

Service de gastroenterologie, Hepatologie et nutrition, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine; Montréal, Qué., Canada

(Submitted 27 October 2003; Accepted with revisions 24 February 2004)

Hepatitis C infection is associated with autoimmune disorders, such as the production of autoantibodies. Anti-LKM1 and anti-LC1, immunomarkers of type 2 autoimmune hepatitis, have been previously associated with a HCV infection. Anti-Soluble-Liver-Antigen autoantibodies (SLA) are specifically associated with type 1 and type 2 autoimmune hepatitis and more closely related to patients who relapse after steroid therapy. The recent molecular cloning of the soluble liver antigen provides the opportunity to develop more specific tests for the detection of antibodies against it. The aim of this work is to characterize anti-soluble-liver autoantibodies in sera from patients chronically infected by HCV. A recombinant cDNA from activated Jurkat cells coding for the full length tRNP^(Ser)^{Sec}/SLA antigen was obtained. ELISA, Western Blot and immunoprecipitation tests were developed and used to search for linear and conformational epitopes recognized by anti-SLA antibodies in sera from patients chronically infected by HCV. Anti-soluble liver antigen antibodies were found in sera from 10.4% of HCV-infected patients. The prevalence was significantly increased to 27% when anti-LKM1 was also present. Most anti-SLA reactivity was directed against conformational epitopes on the antigen. The means titers by ELISA were lower than those obtained in type 2 AIH. The result of autoantibody isotyping showed a subclass restriction to IgG1 and also IgG4. This study shows the presence of anti-SLA antibodies in approximately 10% of HCV infected patients. The prevalence of SLA autoantibodies in HCV infected patients increases when LKM1 autoantibodies are also present. The relationship between the prevalence of this characteristic autoimmune hepatitis autoantibody and the implication of an autoimmune phenomenon in the liver injury of patients chronically infected by HCV needs further investigation.

Keywords: Hepatitis C virus; Autoimmune hepatitis; Soluble liver antigen (SLA); Autoantibodies

Abbreviations: aa, amino acid; AIH, autoimmune hepatitis; bp, base pair; ELISA, enzyme-linked immuno-assay; FTCD, formiminotransferase cyclodeaminase; HCV, hepatitis C virus; IgG, immunoglobulin G; IPA, immunoprecipitation assay; LC1, liver cytosol type 1; LKM1, liver kidney microsome type 1; PCR, polymerase chain reaction; SDS/PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel; SLA, soluble liver antigen; WB, western blot

INTRODUCTION

Hepatitis C virus infection has been associated with the presence of autoimmune reactions, sometimes revealed during interferon therapy.^[1] These autoimmune phenomena include cryoglobulinemia, diseases associated with the production and/or deposit of immune complexes and the presence of autoantibodies.^[2–5] A cross-recognition between HCV and host epitopes may be involved in the mechanism by which the HCV infection triggers the production of autoantibodies.

Anti-liver/kidney microsome antibody type 1 (LKM1) and anti-liver cytosol antibody type 1 (LC1) are specific

markers of autoimmune hepatitis (AIH) and define patients with distinctive clinical and prognosis features which are classified as type 2 AIH.^[6,7] These autoantibodies have also been found associated with HCV infection. The frequency of anti-LKM1 in HCV infected patients was reported as 3–5%. These LKM1 autoantibodies are different from those found in type 2 AIH when epitopes specificities and titers are compared.^[8,9] The association of anti-LC1 with HCV infection has not been carefully studied.

The clinical value of anti-SLA antibodies has been controversial. Initially, the existence of a type 3 AIH was proposed and was specifically characterized by

*Corresponding author. Tel.: +1-514-345-4626. Fax: +1-514-345-4999

the presence of anti-SLA antibodies. At that time, sensitive tests to detect anti-SLA antibodies were not available. Recently, the target of anti-soluble liver antigen antibodies (anti-SLA) has been identified and provided the opportunity to test for anti-SLA antibodies using more specific and sensitive tests. Molecular cloning of the antigen shows that anti-SLA autoantibodies are directed against an UGA-suppressor transfer RNA (tRNA)-associated protein which is probably involved in cotranslational selenocystein incorporation in human cells.^[10,11]

The analysis of reactivity using new serological tests reveals that anti-SLA antibodies are immunomarkers associated with type 1 and type 2 AIH and are more frequently found in patients who relapse after corticosteroid therapy.^[10-14] No studies are available on the investigation of this autoantibody in a large series of HCV infected patients.

This work was conducted to establish the prevalence and characterize the type of autoantibodies present in sera from HCV positive patients. A recombinant cDNA from Jurkat cells coding the full length of tRNP^{(Ser)Sec}/SLA antigen was obtained. In order to test for reactivity against linear and conformational epitopes, specific enzyme-linked immuno-assay (ELISA), western blot (WB) and immuno-precipitation assay (IPA) were developed. Finally, the prevalence of anti-SLA antibodies was compared between HCV + /LKM1 + and HCV + /LKM1 - sera to better analyze the B-cell autoimmune response in patients with HCV chronic infection.

MATERIALS AND METHODS

Patients

48 sera from patients chronically infected by HCV were used to evaluate the prevalence of anti-SLA in the general HCV(+) population using various methods (ELISA, WB, IPA). To further characterize the presence and reactivity of SLA antibodies and their possible association with other autoantibodies, 100 sera from patients chronically infected by HCV were evaluated by ELISA and western blot using a procaryotically recombinant chimera protein (GST-SLA), and eukaryotically expressed tRNP^{(Ser)Sec}/SLA (14) as target in an IPA. HCV positive sera were separated into two groups, 58 of 100 were HCV(+)/LKM1(+) and 42 of 100 were HCV(+)/LKM(-).

As controls, 126 HCV(-) serum samples were chosen randomly from the following groups: 26 patients with chronic hepatitis B infection, 3 patients with chronic hepatitis B associated with Delta virus infection (LKM3 +), 6 patients with macrolide-induced cholestasis, 14 patients with idiopathic chronic active hepatitis, 25 liver transplant recipients, 7 patients with Crohn's disease, 8 patients with primary biliary cirrhosis, 13 patients with extra-hepatic auto-immune disorders and 24 healthy subjects.

Autoantibodies Testing

Serum samples were tested by indirect immunofluorescence (IIF) on rat liver and kidney to detect LKM1 and LC1. Anti-LKM1 and anti-LC1 reactivity were also assessed by western blotting using microsomal and cytosolic fractions from human livers,^[15] by ELISA and western blotting using a recombinant chimera protein covering cytochrome P4502D6 (CYP2D6) and formiminotransferase-cyclodeaminase (FTCD) antigenic sites^[16] and by IPA using ³⁵S-Methionine labeled FTCD and CYP2D6.

Detection of Viral Markers

Anti-HCV was determined by a commercially available third-generation Ortho enzyme-linked immunoassay, and confirmed by recombinant immunoblot assay RIBA III (Ortho Diagnostic System). HCV-RNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

In Vitro Transcription and Translation of tRNP^{(Ser)Sec}/SLA

Briefly, the tRNP^{(Ser)Sec}/SLA cDNA obtained from Jurkat cells RNA (genbank accession number AJ238617) was cloned into the transcription vector pCRII-TOPO as previously described.^[14] The 422 amino acids protein was obtained by *in vitro* transcription and translation of 2 µg of tRNP^{(Ser)Sec}/SLA cDNA. This process was carried out using TNT-coupled Reticulocyte Lysate kit (Promega, Madison, WI) in a volume of 50 µl at 30°C for 2 h in the presence of T7 RNA polymerase and 1 mCi /ml ³⁵S-methionine (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). The radioactivity incorporated was evaluated following trichloroacetic acid precipitation of the translation product. The resulting protein was analyzed by 10% SDS-PAGE.

Immunoprecipitation

The *in vitro* synthesized ³⁵S-Methionine tRNP^{(Ser)Sec}/SLA was immunoprecipitated as described.^[16] Briefly, 6.0 × 10⁵ cpm of labeled tRNP^{(Ser)Sec}/SLA was incubated overnight at 4°C with 5 µl of patients' sera in NET buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.25% gelatin). Antibody-bound to labeled tRNP^{(Ser)Sec}/SLA was isolated with protein A sepharose (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and washed three times with RIPA buffer (1% NP-40, 1% DOC, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 7.4). The resulting pellet was resuspended in sample buffer and analyzed by 10% SDS-PAGE. Sera from AIH patients were assayed in duplicate.

ELISA

Microwell ELISA plates (Corning Inc., New York, NY) were coated, overnight at 4°C with 0.1 µg of the purified

SLA recombinant fusion proteins and GST purified protein in 0.1M NaHCO₃ (pH 8.6) as previously described.¹¹⁴¹ The plates were subsequently washed twice with TBST and incubated with 200 μ l of blocking solution (TBST/5% bovine serum albumin) at 37°C for 1 h. After six washes, the plates were incubated with 100 μ l of diluted serum (1:100 to 1:25,600) at 37°C for 1 h, re-washed six times and incubated with alkaline-phosphatase conjugated anti-human IgG at 1:3000 dilution (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON), for 1 h at 37°C. Alkaline phosphatase activity retained in the wells was assayed by the addition of 100 μ l of *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) and measured at 405 nm by a microtiter plate reader. In each assay, positive and negative sera were included as controls. Nonspecific background absorbance obtained with diluted sera incubated with GST protein was subtracted as background. Optical Densities (ODs) exceeding three times the mean OD of negative controls at each dilution assayed were considered positive. The optimal antigen concentration for ELISA was obtained by measuring ODs versus different concentrations of recombinant fusion proteins. The mean OD of antibody reactivity was linear over a range of 0.1–0.6 μ g/well. The highest OD with the least nonspecific background (measured by reading the OD of sera incubated with GST-binding protein) was obtained at the antigen concentration of 0.1 μ g/well.

Western Blot Analysis

For Western blot analysis, 0.2 μ g of recombinant protein was separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose filters. All sera tested were used at 1:100 dilutions as the first antibody. The second antibody was rabbit anti-human IgG conjugated to peroxidase (Bio-source International). Bound peroxidase was detected by chemiluminescence blotting substrate (Roche Mannheim).

Antibody Isotyping

The isotype of the immunoglobulins against SLA was determined by ELISA. Purified GST/SLA was used as described above. Microwells ELISA plates were incubated with SLA-positive sera at dilution 1:100, washed and incubated with one of the following biotin conjugated secondary antibodies: anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgG4, anti-IgM and anti-IgA (Sigma-Aldrich, Canada Ltd). Biotin retained in the wells was coupled to avidin/streptavidin bearing peroxidase and detection of peroxidase-activity was assayed by the addition of 100 μ l of *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) and the absorbance was measured at 405 nm.

Statistical Analysis

Mean values of the studied groups were compared by the Student *t*-test. Fisher exact test was applied to compare frequencies of dichotomous variables.

RESULTS

³⁵S Methionine-labeled tRNP^(Ser)Sec/SLA as Antigen to Analyze SLA Antibodies

The specific binding of antibodies from SLA positive sera to tRNP^(Ser)Sec/SLA labeled protein is shown in Fig. 1. Analysis of *in vitro* translated ³⁵S-labeled tRNP^(Ser)Sec/SLA immunoprecipitated with SLA positive sera on SDS-PAGE revealed a band of 50 kDa. Healthy control sera did not precipitate the 50 kDa labeled protein.

Prevalence of Anti-SLA in the Chronically Infected HCV Populations

As shown in Table I, anti-SLA antibodies were detected in 5 of 48 of HCV infected sera by IPA. Only 3 out of 5 HCV(+)/SLA(+) by IPA were positive when tested by ELISA and WB. These results assessed the prevalence of anti-SLA autoantibodies in HCV chronically infected patients as 10.4%. Because no control sera reacted against the SLA antigen, it is possible to consider the specificity of the ELISA, IPA and WB as 100%. Since IPA preferentially detects reactivity against conformational epitopes, this result shows that most anti-SLA antibody reactivity is directed against structural epitopes of the antigen.

Autoantibodies Profiles in Anti-SLA Reactive Patients

Sera from 100 HCV infected patients were separated into two groups according to their reactivity by IPA against labeled CYP2D6 and by immunoblotting using human liver microsomes. Fifty eight of 100 sera were HCV(+)/LKM1(+) and 42 were HCV(+)/LKM1(−). Sixteen of 58 (27.6%) HCV(+)/LKM1(+) sera reacted with

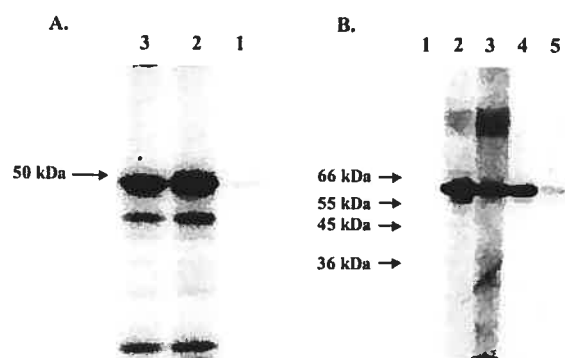


FIGURE 1 Characterization of recombinant Soluble-Liver-Antigen protein. **A.** Immunoprecipitation of *in vitro* transcribed and translated tRNP^(Ser)Sec/SLA cDNA. Using the ³⁵S-tRNP^(Ser)Sec/SLA protein an IPA was performed with: (1) Serum from a healthy subject, (2) Serum from a LKM1(−)/HCV(+) patient, (3) Serum from a LKM1(+)/HCV(+). **B.** Western Blot analysis using SLA/GST recombinant fusion protein. The recombinant SLA/GST fusion protein was separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose and then incubated with (1) Serum from a healthy control (1:100); (2) serum from a HCV(+)/LKM1(+)/SLA(+) patient (1:100); and (3–5) HCV(+)/LKM1(−)/SLA(+) patients (1:100) showing various levels of reactivity.

TABLE I Prevalence of anti-SLA antibodies in HCV chronically infected patients

	No of patients	Anti-SLA (+)		
		ELISA	WB	IPA
HCV infected patients	48	3/48	3/48	5/48
Healthy control	24	0/24	0/24	0/24
Hepatitis B virus infection	29	0/29	0/29	0/29
Idiopathic active hepatitis	14	0/14	0/14	0/14
Liver transplant recipients	25	0/25	0/25	0/25
Macrolide-induced cholestasis	6	0/6	0/6	0/6
Primary biliary cirrhosis	8	0/8	0/8	0/8
Crohn's disease	7	0/7	0/7	0/7
Autoimmune disorders	13	0/13	0/13	0/13

Prevalence of anti-SLA autoantibodies in the general HCV infected population and in control groups using various techniques (ELISA, Western Blot and Immunoprecipitation assay).

³⁵S-labeled tRNP^(Ser)Sec/SLA by IPA and only 5 of 42 (12%) in the HCV(+)/LKM1(-) group (Fig. 2). When the recombinant fusion protein was used as antigen in ELISA and WB tests, 15 of 58 (26%) and 11 of 58 (19%) HCV(+)/LKM1(+) sera respectively were found positive. In the HCV(+)/LKM1(-) group, 5 of 42 (12%) and 3 of 42 (7%) were positive when tested by ELISA and WB respectively (Table II). Because the SLA recombinant protein is a GST fusion protein, all sera were tested for reactivity against the GST-protein alone by ELISA and WB. No sera reactivity against this antigen was found in any patient's sera (Fig. 1).

As is shown in Fig. 2, six patients in the HCV(+)/LKM1(+) group were also positive for anti-LC1 when tested by IPA with ³⁵S-labeled-FTCD and WB using human liver cytosol fraction. Two of 6 (33%) sera were also positive for anti-SLA antibodies with a mean titers value of 600 ± 282 . Fifty two of 58 HCV(+)/LKM1(+) sera were negative for anti-LC1 antibodies, but when these sera were tested for the presence of anti-SLA, 14 of 52 (27%) were found positive with a mean titer value of 457 ± 241 . Anti-LC1 antibodies were also present in 6 of 42 (14%) HCV(+)/LKM1(-) sera. Reactivity against SLA was found in one of these 6 patients at a titer of 400. Anti-SLA antibodies were also found in 4 of 36 (11%) of anti-LC1(-) sera at an average titer of 400 ± 282 .

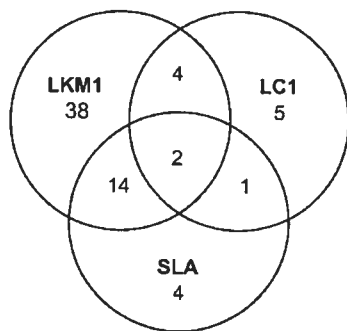


FIGURE 2 Correlation of Anti-SLA antibodies with other autoantibodies in HCV(+) patients. Anti-SLA reactivity in various subpopulations of HCV infected patients. Total = 100 HCV(+) patient's sera.

No statistical differences were found between titers of the different groups studied.

Nature of Autoantibodies Detected by Immunoanalysis

To further characterize the immunological response against anti-SLA, isotyping of the immunoglobulins involved was performed, and two patterns emerged. The first pattern showed a high prevalence of anti-SLA antibodies of the IgG1 subclass and the second one a strong IgG1 response associated with a weak presence of IgG4 subclass. In the HCV(+)/LKM1(+) group, 13 of 16 (81%) of anti-SLA autoantibodies were characterized as IgG1 and 3 of 16 (19%) as a combined response of IgG1 and IgG4 antibodies. In the HCV(+)/LKM1(-) group only a response of the IgG1 subclass was observed.

DISCUSSION

It is hypothesized that viruses, such as HCV, may break self-tolerance by overcoming antigenic ignorance, mimicking sequestered epitopes and/or generating neo-epitopes. Molecular mimicry between foreign and self-antigens is the most frequently proposed initiating mechanism.^[17-23] The successful cloning and characterization of HCV enabled the development of serological assays for the diagnosis of this infectious disease.^[24] These specific tests offered the possibility of screening for HCV in different diseases, such as AIH.^[2,8] Historically, a high

TABLE II Characterization of anti-SLA antibodies in LKM1(+) and LKM1(-) patients chronically infected by HCV

	SLA (+) ELISA	SLA (+) WB	SLA (+) IPA
LKM1 (+) N = 58	15/58 26%*	11/58 19%**	16/58 27.6%***
LKM1 (-) N = 42	5/42 12%*	3/42 7%**	5/42 12%***

Anti-SLA antibodies reactivity as detected by ELISA, Western Blot and immunoprecipitation assay in HCV(+)/LKM1(+) and HCV(+)/LKM1(-) patients. *P = 0.04, **P = 0.07 and *** P = 0.04.

prevalence of HCV antibodies in patients' sera with anti-LKM1 had initially been found. Autoantibodies of type 2 AIH (anti-LKM1 and/or anti-LC1) were also found in sera of patients chronically infected by HCV, sometimes revealed during an unusual response in the course of an interferon therapy.^[9,25–27] Currently, the main issue is to understand the origin of this autoimmune phenomenon associated with a chronic HCV infection and its possible similarity with factors triggering AIH.

The results of this study show that antibodies directed against SLA are present in sera from 10.4% of HCV-infected patients tested. In patients where anti-LKM1 is also present, the prevalence of anti-SLA antibodies increased to 27.5%. Only 2 of 6 anti-LC1 positive patients in the HCV(+)/LKM1(+) group ($N = 58$) and 1 of 6 anti-LC1 positive sera from HCV(+)/LKM1(-) group ($N = 42$) reacted against the SLA antigen. These results are in contrast with those previously published in which SLA autoantibodies were not found in HCV(+)/LKM1(-) patients.^[28,29] This difference could be explained by the sensitivity of the techniques used in this study, and the possibility they offered to detect antibodies against conformational and linear epitopes. Although the role of these autoantibodies in the immunopathogenesis of AIH and HCV infection is still unknown, these results show that anti-SLA antibodies are frequently found in sera from HCV chronically infected patients and its presence depends on similar mechanisms to those generating an anti-LKM1 autoimmune response.

The high recognition rate in IPA and ELISA test compared to WB indicates that a large proportion of anti-SLA positive sera in patients infected by HCV contain only antibodies that recognize conformational epitopes on the SLA antigen. This observation is similar to what has been found for anti-SLA antibodies in AIH.^[14] The mean value titer for anti-SLA measured in the analyzed groups, associated or not to the presence of anti-LC1 and anti-LKM1 antibodies was not significantly different ($p = 0.5$). The mean titer values of anti-SLA antibodies in patients infected by HCV tested by ELISA is significantly lower than in type 2 AIH ($1:1, 300 \pm 339, p = 0.001$).^[14]

Sera from patients chronically infected by HCV showed a higher percentage of reactivity by Western Blot than sera from AIH patients. Therefore, HCV positive sera more frequently recognized linear epitopes on the SLA antigen. This would suggest that in patients infected chronically by HCV, anti-SLA antibodies heterogeneity would be higher than in patients with AIH. Antibody isotyping showed that anti-SLA antibodies in HCV-infected patients were mostly of IgG1 subclass, with a weak response of IgG4 subclass. This type of subclass restriction was also observed in sera from AIH patients.^[14] In addition, no patient with anti-SLA of IgM type was found. Although no positive reaction was found in the control group, the possibility that it would appear with more sensitive and specific test should not be excluded.

Our data show a relatively high prevalence of anti-SLA autoantibodies in sera from patients infected by HCV,

which is significantly higher when anti-LKM1 is also present. The isotype of antibodies shows a secondary response probably caused by a repeated B-cell activation in a long lasting infection. Since the link between the presence of anti-SLA, as well as other autoantibodies such as anti-LC1 and/or anti-LKM1, and the HCV infection is not known, further studies should be carried out in order to characterize the B cell response in patients chronically infected by HCV, and study a possible relationship with antiviral treatment.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research, grant MT-15659 to F.A.

References

- [1] Czaja, A.J. (1998) "Treatment of autoimmune hepatitis", In: Krawitt, E.L., Wiesner, R.H. and Nishioka, M., eds, *Autoimmune Liver Diseases*, 2nd Ed. (Elsevier, Amsterdam), pp 499–515.
- [2] Fusconi, M., Lenzi, M., Ballardini, G., Miniero, R., Cassani, F., Zauli, D. and Bianchi, F.B. (1990) "Anti-HCV testing in autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis", *Lancet* **336**, 823.
- [3] Quaranta, J.F., Tran, A., Regnier, D., Letestu, R., Beusnel, C., Fuzibet, J.G., Thiers, V. and Rampal, P. (1993) "High prevalence of antibodies to hepatitis C virus (HCV) in patients with anti-thyroid autoantibodies", *J. Hepatol.* **18**, 136–138.
- [4] Johnson, R.J., Gretch, D.R., Yamabe, H., Hart, J., Bacchi, C.E., Hartwell, P., Couser, W.G., Corey, L., Wener, M.H., Alpers, C.E., et al. (1993) "Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection", *N. Engl. J. Med.* **328**, 465–470.
- [5] Divano, M.C., Parodi, A. and Rebora, A. (1994) "Anti-GOR antibodies in lichen planus", *Dermatology* **188**, 205–206.
- [6] Alvarez, F., Berg, P.A., Bianchi, F.B., Manns, M.P., McFarlane, I.G., Meyer zum Buschenfelde, K.H., et al. (1999) "International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis", *J. Hepatol.* **31**, 929–938.
- [7] Czaja, A.J. (1999) "Behaviour and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis", *J. Hepatol.* **30**, 394–401.
- [8] Lunel, F., Abuaf, N., Frangeul, L., Gripon, P., Perrin, M., Le Coz, Y., Valla, D., Borotto, E., Yamamoto, A.M., Hureau, J., et al. (1992) "Liver/kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection", *Hepatology* **16**, 630–636.
- [9] Yamamoto, A.M., Cresteil, D., Homberg, J.C. and Alvarez, F. (1993) "Characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM1) from hepatitis C virus-positive and -negative sera", *Gastroenterology* **104**, 1762–1767.
- [10] Wies, I., Brunner, S., Henninger, J., Herkel, J., Kanzler, S., Meyer zum Buschenfelde, K.H., et al. (2000) "Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis", *Lancet* **355**, 1510–1515.
- [11] Costa, M., Rodriguez-Sanchez, J.L., Czaja, A.J. and Gelpi, C. (2000) "Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP^{Ser}_{Sec} complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis", *Clin. Exp. Immunol.* **121**, 364–374.
- [12] Czaja, A.J., Donaldson, P.T. and Lohse, A.W. (2002) "Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type 1 autoimmune hepatitis", *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 413–419.
- [13] Ma, Y., Okamoto, M., Thomas, M.G., Bogdanos, D.P., Lopes, A.R., Portmann, B., et al. (2002) "Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease", *Hepatology* **35**, 658–664.
- [14] Vitozzi, S., Djilali-Saiah, I., Lapiere, P. and Alvarez, F. (2002) "Anti-Soluble Liver Antigen/Liver Pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis", *Autoimmunity* **35**, 485–492.

- [15] Amar-Costesec, A., Beaufay, H., Wibo, M., Thines-Sempoux, D., Feytmans, E., Robbi, M., *et al.* (1974) "Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. II. Preparation and composition of the microsomal fraction", *J. Cell. Biol.* **61**, 201–212.
- [16] Vitozzi, S., Lapierre, P., Djilali-Saiah, I. and Alvarez, F. (2002) "Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant fusion protein", *J. Immunol. Methods* **262**, 103–110.
- [17] Lunardi, C., Tiso, M., Borgato, L., Nanni, L., Millo, R., De Sandre, G., Severi, A.B. and Puccetti, A. (1998) "Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with autoantigen binding properties", *Eur. J. Immunol.* **28**, 936–948.
- [18] Wucherpfennig, K.W. and Strominger, J.L. (1995) "Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein", *Cell* **80**, 695–705.
- [19] Manns, M.P., Griffin, K.J., Sullivan, K.F. and Johnson, E.F. (1991) "LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase", *J. Clin. Invest.* **88**, 1370–1378.
- [20] Kammer, A.R., van der Burg, S.H., Grabscheid, B., Hunziker, I.P., Kwappenberg, K.M., Reichen, J., Melief, C.J. and Cerny, A. (1999) "Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition", *J. Exp. Med.* **190**, 169–176.
- [21] Bogdanos, D.P., Choudhuri, K. and Vergani, D. (2001) "Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences", *Liver* **21**, 225–232.
- [22] Kerkar, N., Choudhuri, K., Ma, Y., Mahmoud, A., Bogdanos, D.P., Muratori, L., Bianchi, F., Williams, R., Mieli-Vergani, G. and Vergani, D. (2003) "Cytochrome P450D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease", *J. Immunol.* **170**, 1481–1489.
- [23] Gregorio, G.V., Choudhuri, K., Ma, Y., Pensati, P., Iorio, R., Grant, P., Garson, J., Bogdanos, D.P., Vegnente, A., Mieli-Vergani, G. and Vergani, D. (2003) "Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection", *Clin. Exp. Immunol.* **133**, 404–413.
- [24] Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G. and Choo, Q.L. (1991) "Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease", *Hepatology* **14**, 381–388.
- [25] Lenzi, M., Manotti, P., Muratori, L., Cataleta, M., Ballardini, G., Cassani, F. and Bianchi, F.B. (1995) "Liver cytosolic I antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection", *Gut* **36**, 749–754.
- [26] Yamamoto, A.M., Johanet, C., Duclos-Vallee, J.C., Bustarret, F.A., Alvarez, F., Homberg, J.C. and Bach, J.F. (1997) "A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type-2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay", *Clin. Exp. Immunol.* **108**, 396–400.
- [27] Perez, N., Herzog, D., Jacqz-Aigrain, E., Homberg, J.C. and Alvarez, F. (1996) "Study of the B cell response to cytochrome P450IID6 in sera from chronic hepatitis C patients", *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 336–343.
- [28] Ballot, E., Homberg, J.C. and Johanet, C. (2000) "Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis", *J. Hepatol.* **33**, 208–215.
- [29] Nishioka, M., Morshed, S.A., Parveen, S., Kono, K., Matsuoka, H. and Manns, M.P. (1997) "Antibodies to P450IID6, SLA, PDH-E2 and BCKD-E2 in Japanese patients with chronic hepatitis", *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 862–868.

Justification de la participation aux articles

Le premier article est un article dont je suis le premier auteur. De ce fait, la presque totalité des manipulations en laboratoire ainsi que la rédaction de l'article ont été fait par moi. Les co-auteurs m'ont aidé dans la réalisation de certaines expériences et ils ont été des conseillers et correcteurs lors de la rédaction de l'article. Enfin, mon directeur de recherche m'a dirigé dans mes réflexions, ma recherche de la littérature et pour les résolutions de problèmes rencontrés lors de la progression de ce projet.

En ce qui concerne le deuxième article, j'ai participé à titre de co-auteur. Dans ce projet, j'ai collaboré à la réalisation d'expériences (surtout aux immunoprécipitations) et à la rédaction de l'article. La Figure 2 est un exemple de ma contribution. Cet article faisant état d'une étude reliée et très près de mon premier projet, il s'intègre bien à l'étude de l'ensemble des autoanticorps présents dans l'infection chronique par le virus de l'hépatite C, soit le sujet de mon mémoire de maîtrise.

Discussion

L'infection par virus de l'hépatite C est estimée à plus de 170 millions d'individus infectés dans le monde entier, soit 3% de la population mondiale (108-110). L'association entre une infection chronique par le virus de l'hépatite C et l'apparition de phénomènes autoimmuns a été largement décrite (35, 38, 114, 118, 123, 124). En effet, plusieurs manifestations autoimmunes, tels que des symptômes rhumatoïdes, une glomérulonéphrite, de la cryoglobulinémie mixte, un lichen plan, une kératoconjonctivite sèche et des autoanticorps circulants, sont retrouvées chez les patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C (125-128).

Des anti-LKM1 ont été retrouvés chez environ 5% des patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C (50, 117). L'apparition et la présence de ces autoanticorps marqueurs de l'hépatite autoimmune de type II sont encore incompréhensibles. Le fait de retrouver ces autoanticorps dans le sérum des patients VHC+ suggère qu'une réponse autoimmune peut contribuer à la destruction du foie dans l'infection au VHC (129).

Puisque des anti-LKM1 ont été retrouvés dans l'infection par le VHC, le but de notre étude était donc de déterminer si d'autres autoanticorps spécifiques à l'HAI, tels que les anti-LC1 et les anti-SLA/LP, étaient présents et à quelle fréquence dans le sérum de ces patients. De plus, nous avons caractérisé ces autoanticorps afin de souligner les différences et les similitudes entre ces marqueurs dans les deux maladies. De telles informations vont permettre de mieux comprendre le développement et l'implication de ces autoanticorps dans ces pathologies du foie.

Détermination de la prévalence

De multiples études se sont portées sur la détermination de la prévalence des autoanticorps marqueurs de l'hépatite autoimmune chez les patients infectés par le VHC. Pour les anti-LKM1, des prévalences se situant entre 0%, 3% et 6% (50, 123, 130) chez l'adulte et entre 8% et 10% (117, 131) chez l'enfant ont été décrites. Ces écarts sont, entre autres, reliés aux techniques de détection utilisées. De même, aucun groupe n'a retrouvé d'anti-SLA/LP chez les patients VHC+ et très peu de patients VHC+/LC1+ ont été décrits. La détection de ces autoanticorps doit être faite en utilisant des techniques sensibles et spécifiques.

Dans notre étude, nous avons utilisé trois techniques en parallèle afin de détecter ces autoanticorps marqueurs de l'hépatite autoimmune dans le sérum des patients VHC+ provenant d'une population pédiatrique et adulte : l'ELISA, l'immunobuvardage et l'immunoprécipitation avec la protéine cible marquée au S³⁵. Ces trois techniques utilisent l'autoantigène humain, ce qui augmente la sensibilité du test. En effet, il a été démontré que seulement 68% des patients qui ont des anti-LC1 associés à l'hépatite C reconnaissent la protéine FTCD de rat comparativement à 100% pour la protéine humaine (132, 133). De plus, la comparaison entre la séquence de la FTCD humaine et celle de rat montre des différences dans la séquence d'acides aminés d'un épitope linéaire identifié pour l'hépatite autoimmune (86). Ces études suggèrent que l'utilisation de l'autoantigène humain est préférable à celui de rat.

D'autre part, la technique d'immunoprécipitation est réalisée en présence d'une protéine sous sa forme native et non en présence d'une protéine dénaturée tel que dans l'immunobuvardage. Cette caractéristique permet la détection des anticorps qui sont dirigés contre des épitopes dit conformationnels, rendant cette technique beaucoup plus sensible. Puisque l'on sait que la majeure partie des anticorps que nous produisons sont dirigés contre des déterminants conformationnels (environ 90%) (134, 135) et puisque 70% des patients VHC+ qui ont des anti-LKM1 dans leur sérum reconnaissent

seulement la protéine non dénaturée (38), l'utilisation d'une technique non dénaturante est requise pour une détection sensible des autoanticorps.

Finalement, les techniques d'ELISA et d'immunoprécipitation utilisent l'autoantigène purifié. Cette caractéristique a pour effet d'augmenter la spécificité des tests, puisque les autoanticorps vont réagir contre la protéine cible seulement, diminuant ainsi le bruit de fond comme on l'observe en immunofluorescence sur des coupes de foies ou dans l'immunobuvardage sur de l'homogénat de foie. Ces trois techniques combinées nous permettent donc d'avoir une détermination sensible et spécifique des autoanticorps de l'hépatite autoimmune dans l'infection chronique par le virus de l'hépatite C.

Notre étude n'est pas la première qui se penche sur la présence des anti-LC1 chez les patients VHC+. En 1994, des anti-LC1 ont été retrouvés chez 1 patient sur 229 testés par immunobuvardage sur du cytosol de rat (136). D'autre part, Lenzi *et al.*, en 1995, (132) ont trouvé des anti-LC1 chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C mais ils n'ont pas déterminé la prévalence dans leur population. Pour notre part, 12% des patients infectés chroniquement par le VHC ont été trouvés positifs pour les anti-LC1 (121). Ces pourcentages chutent à 5% et 6% respectivement lorsqu'ils sont testés par immunobuvardage ou par ELISA. Plusieurs sérums positifs sont donc considérés comme des faux négatifs puisque ces deux techniques permettent seulement la reconnaissance des anticorps dirigés contre des épitopes linéaires. Ceci permet toutefois de conclure qu'une certaine proportion des patients qui ont des anti-LC1 dans leur sérum ne sont détectables que par des techniques non dénaturantes telle que l'immunoprécipitation. Nous pouvons donc affirmer que certains sérums n'ont donc que des anti-LC1 dirigés contre des épitopes conformationnels. Ces autoanticorps doivent être cherchés en optant pour une technique très sensible, non dénaturante et utilisant la protéine humaine et non celle de rat (132, 133).

En ce qui concerne les anti-SLA/LP, 10,4% des patients de notre population infectée par le VHC ont des anti-SLA/LP dans leur sérum (122). Tout comme les anti-LC1, aucune autre étude antérieure n'avaient retrouvé d'anti-SLA/LP dans d'autres pathologies que

l'hépatite autoimmune, ils étaient donc considérés comme des marqueurs spécifiques de celle-ci (137, 138). Le développement d'un test sensible et spécifique utilisant l'antigène produit *in vitro* explique le fait que cette étude est la première à trouver des anti-SLA/LP chez des patients infectés par le VHC. La présence de ces autoanticorps, généralement présent seulement chez les patients atteint d'hépatite autoimmune, chez les patients chroniquement infectés par le VHC suggère un phénomène autoimmun sous-jacent à l'infection.

Aucun sérum contrôle n'a réagit contre les autoantigènes étudiés, et ce par les trois techniques utilisées. Ceci montre que la présence de ces autoanticorps reste limitée à l'HAI et à l'infection chronique par le VHC. Cette absence de réactivité des sérums de patients avec d'autres maladies chroniques du foie nous permet aussi de conclure qu'ils n'apparaissent pas seulement suite à un bris des cellules du parenchyme hépatique. Donc la génération de ces autoanticorps requiert d'autres facteurs, tel qu'un microenvironnement favorable ou un mimétisme moléculaire.

Réactivité des autoanticorps

La combinaison de plusieurs techniques de détection d'anticorps permet de déduire certaines propriétés de ces derniers. Les sérums des patients infectés par le VHC ont tous été testés par immunobuvardage, par ELISA et par immunoprécipitation. Comme mentionné plus haut, les techniques d'ELISA et d'immunobuvardage permettent la détection des anticorps dirigés contre des épitopes linéaires tandis que la technique d'immunoprécipitation, qui utilise la protéine cible sous sa forme native, permet la détection des anticorps dirigés contre des épitopes linéaires et conformationnels situés sur la surface de la molécule.

Pour la majeure partie des sérums, les anti-LC1 étaient dirigés exclusivement contre des épitopes conformationnels puisque seulement le tiers des patients LC1+ ont réagi en immunobuvardage. De plus, ces mêmes sérums, et seulement ceux-ci, ont réagi en ELISA, rendant ces deux techniques également sensibles pour la détection des anti-LC1

chez les patients infectés par le VHC. Cette réactivité est différente de celle que l'on retrouve pour les anti-LC1 dans l'hépatite autoimmune où tous les patients étudiés à ce jour ont des anticorps qui reconnaissent la FTCD humaine dénaturée (85, 86).

D'autre part, les anti-SLA/LP ont eux aussi réagi en présence de l'autoantigène non dénaturé alors qu'un peu plus de la moitié de ces sérums sont positifs lorsqu'une technique dénaturante est utilisée (immunobuvardage). La réactivité est intermédiaire lorsqu'une technique d'ELISA est utilisée. Les anti-SLA/LP sont donc majoritairement dirigés contre des épitopes conformationnels retrouvés sur l'autoantigène replié. Cette réactivité est comparable avec celle observée dans l'hépatite autoimmune où, pour certains patients, les anti-SLA/LP sont dirigés seulement contre des épitopes conformationnels (53).

La réactivité dominante contre des épitopes conformationnels de ces deux autoanticorps correspond à ce qui avait été trouvé pour la réactivité des anti-LKM1 dans l'infection chronique par le virus de l'hépatite C. Dans ce cas, seulement 30% des patients reconnaissent la P450 2D6 dénaturée (82, 139). Le microenvironnement immunologique entourant l'infection par le virus de l'hépatite C modifie probablement la formation de ces autoanticorps soit par une présentation différente de l'autoantigène, une activation différente des lymphocytes ou un traitement différent de la protéine cible par les cellules présentatrices d'antigènes. D'autre part, environ 90% des anticorps que nous produisons sont dirigés contre des épitopes conformationnels (134, 135). L'autre 10% reconnaissant des épitopes linéaires survient probablement suite une longue exposition à l'antigène, et se développe via le phénomène d'étalement des épitopes («epitope spreading»). Il n'est donc pas surprenant de retrouver une plus grande proportion d'autoanticorps dirigés contre des déterminants conformationnels. La liaison des anticorps à leur antigène se faisant contre des épitopes tridimensionnels et de façon dynamique, l'étude des anticorps devrait être toujours considérée comme faisant partie d'un système en quatre dimensions, la quatrième étant le temps (140).

Le mimétisme moléculaire a souvent été évoqué pour expliquer l'apparition d'autoanticorps dans l'hépatite autoimmune et dans l'hépatite C (119, 141, 142). Toutefois, très peu d'évidences expérimentales supportent ces hypothèses. La caractéristique même de ces autoanticorps, dirigés préférentiellement contre des sites antigéniques structurels, rend nos recherches plus ardues. En effet, le mimétisme moléculaire doit être cherché au niveau de la structure tridimensionnelle des protéines, ce qui représente un défi considérable puisqu'une telle étude requiert que les protéines d'intérêt soient cristallisées et que les outils informatiques de pointe soient disponibles. Notre équipe tente présentement de trouver des homologies conformationnelles entre le P450 2D6 et les protéines NS3 et NS5 du virus de l'hépatite C, car une réaction croisée des anti-LKM1 a été trouvée avec ces protéines virales (143).

Lien entre les autoanticorps

Le lien possible entre les divers autoanticorps spécifiques à l'HAI demeure encore inconnu. Le fait de retrouver la même combinaison d'autoanticorps dans les deux pathologies suggère qu'il existe un lien possible entre eux, qu'il se situe au niveau du déclenchement de la maladie ou comme une conséquence de l'atteinte autoimmune. Puisque nous ne comprenons pas ce qui entraîne la formation de ces divers autoanticorps il est intéressant d'étudier leur association dans l'infection par le VHC.

Lors de l'étude des anti-LC1 dans l'infection au VHC, aucune différence n'a été trouvée dans la prévalence de ces anticorps lorsque le groupe était subdivisé selon la présence ou l'absence des anti-LKM1 (voir FIGURE 10). La présence des anti-LC1 semble donc totalement indépendante de la présence des anti-LKM1 chez ces patients. L'observation est tout autre lorsque l'on étudie les anti-SLA/LP. En effet, la prévalence de 10,4% dans la population mixte de VHC+ monte à 27,5% lorsque les anti-LKM1 sont aussi présents dans le sérum des patients VHC+. Ceci suggère qu'il pourrait exister un lien dans la génération de ces deux autoanticorps, du moins dans l'infection chronique par le VHC. Ces derniers semblent indépendants dans l'HAI de type II puisque les anti-SLA/LP sont

retrouvés autant dans le type I que dans le type II (50% vs 44%) (53). Toutefois, ces autoanticorps ont été trouvés plus fréquemment lorsque le titre des anti-LKM1 et des anti-LC1 étaient élevés dans le sérum des patients qui ont l'HAI de type II (53). Ceci indique que les anti-SLA/LP sont mis en évidence quand les signes d'autoimmunité sont plus évidents.

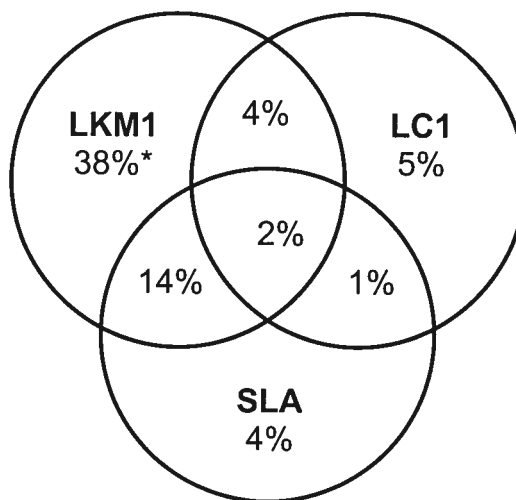


FIGURE 10 : Association entre les divers autoanticorps spécifiques de l'hépatite autoimmune dans l'infection chronique par le virus de l'hépatite C. Les pourcentages représentent la proportion de patients qui ont été trouvés positifs par immunoprécipitation dans une population de 100 patients infectés de façon chronique par le VHC. (122)

**La proportion de patients positifs pour les anti-LKM1 ne représente pas la prévalence normale puisque ces sérums ont été choisis en raison de leur réactivité pour les anti-LKM1.*

En ce qui concerne le lien entre les anti-LC1 et les anti-SLA/LP dans l'infection au VHC, aucune corrélation n'a été trouvée. Au total, seulement 2 patients infectés par le VHC, soit 2%, ont été trouvés positifs pour les trois autoanticorps spécifiques de l'HAI. (voir FIGURE 10)

Isotypage

L'isotypage des autoanticorps peut nous renseigner sur le type de réponse immunitaire en place. Lors d'une réponse immunitaire normale, les IgM sont les premiers types d'anticorps à apparaître. Alors que la réponse continue, il se produira un changement d'isotype vers les IgG, les IgE, ou les IgA selon la réponse appropriée déterminée par les CD4+. Les IgE sont retrouvés lors d'une infection parasitaire, les IgA dans la réponse antivirale, et les IgG sont les plus abondants et les plus versatiles. Ces derniers peuvent neutraliser des toxines, activer le complément et faire de l'opsonisation. Ils sont aussi les seuls à pouvoir traverser la barrière placentaire.

Ensuite, la réponse B s'affine et développe des sous-classes d'anticorps tels que les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les IgG1 sont les plus fréquemment retrouvés. Les IgG1 et IgG3 sont produits lors d'une réponse Th1 alors que toutes les sous-classes sont retrouvées dans une réponse Th2. De plus, la présence d'autoanticorps de sous-classe IgG4 est souvent rencontrée dans les maladies autoimmunes organes-spécifiques (144, 145).

Un isotypage par ELISA a été réalisé pour les anti-SLA/LP chez des patients infectés par le VHC. Il révèle que les autoanticorps anti-SLA/LP retrouvés sont majoritairement des IgG1 et, à plus faible niveau, des IgG4. Il est intéressant de noter que les mêmes sous-classes d'IgG avaient été trouvées pour les anti-SLA/LP dans l'hépatite autoimmune et aucun IgM n'a été trouvé chez ces patients (53). D'autre part, ces mêmes isotopes et sous-classes sont retrouvés pour les anti-LC1 dans l'hépatite autoimmune de type II (86). La présence d'IgG4 suggère qu'une réponse secondaire est produite contre l'autoantigène probablement due à une activation répétée des lymphocytes B autoréactifs conséquemment à la relâche constante de la protéine cible par le foie (144).

Cartographie des épitopes

L'origine des anti-LC1 dans l'hépatite autoimmune et dans l'infection chronique par le VHC demeure inconnue. Préciser la réactivité de ces autoanticorps dans les deux pathologies contribuera à la compréhension et à l'identification d'un mimétisme moléculaire possible. Les épitopes linéaires des anti-LC1 sont connus dans l'hépatite autoimmune et se retrouvent sur la partie C-terminale de FTCD. Cette région contient l'épitope majeur reconnu par les sérums HAI de type II puisque tous les patients qui ont des autoanticorps anti-LC1 reconnaissent cette portion de FTCD en immunobuvardage (85, 86). Un clone codant pour la région C-terminale de FTCD (le clone LCHC1) est utilisé pour le diagnostic des anti-LC1 (146).

Épitopes linéaires

Afin de comparer la réactivité des anti-LC1 chez les patients VHC avec celle observée dans l'HAI, les sérums ont été testés en immunobuvardage contre la portion C-terminale de FTCD (clone LCHC1). De façon prévisible, seulement les sérums qui avaient été trouvés positifs en immunobuvardage contre la protéine complète ont réagi contre le clone LCHC1. Ceci laisse croire que les patients qui développent des anticorps anti-LC1 contre des épitopes dénaturés réagissent avec la portion C-terminale de la protéine.

Afin d'identifier plus précisément les épitopes linéaires dans cette région, une membrane comportant quarante-huit décamères d'acides aminés se chevauchant a été utilisée. Ces décamères couvrent les acides aminés 412 à 468 de FTCD, soit une portion dans la partie C-terminale de la protéine qui a été déterminée comme très immunogénique par prédiction informatique et qui comporte l'épitope majeur des anti-LC1 dans l'hépatite autoimmune de type II (86). Le peptide LQEGLRRA, qui correspond à la séquence d'a.a. 440 à 447 de la FTCD, a été reconnu par deux patients. Cette séquence représente un épitope qui est reconnu par les anti-LC1 dans l'HAI de type II (86). D'autre part, un seul sérum a reconnu les peptides RLPKNTPE (soit les aa 424 à 431) et PLTLAETV (soit les aa 451 à 458 de FTCD), deux épitopes qui ne sont pas décrits pour l'HAI. (FIGURE 11).

Épitopes conformationnels

Tel que décrit dans l'hépatite autoimmune de type II, plusieurs régions de FTCD peuvent entraîner la formation d'anticorps anti-LC1, pour la plupart dirigés contre des épitopes conformationnels (86, 87). L'analyse des épitopes conformationnels des anti-LC1 dans l'infection par le VHC a donc été faite par immunoprécipitation de quatre constructions de FTCD. Ces constructions étaient de quatre tailles différentes qui débutaient toutes au premier acide aminé de la FTCD (C4 : 1-178, C3 : 1-222, C2 : 1-298, C1 : 1-363) couvrant ainsi plusieurs régions de la protéine. Ces immunoprécipitations ont révélé que les épitopes conformationnels sont distribués sur toute la protéine.

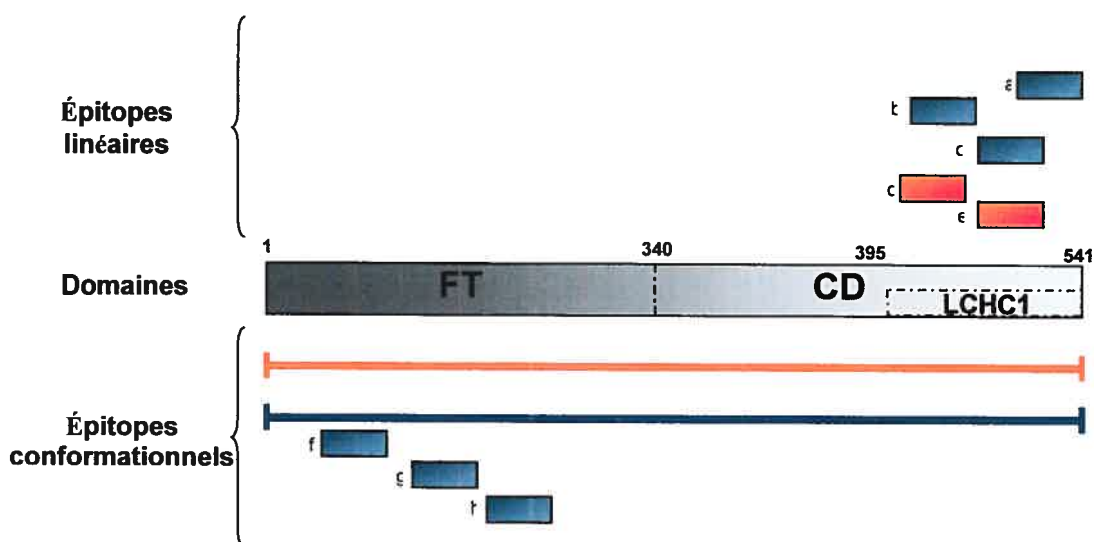


FIGURE 11 : Schéma récapitulatif des épitopes des anti-LC1 chez les patients atteints de l'hépatite autoimmune de type II ou infectés par le virus de l'hépatite C. Dans le haut, les épitopes linéaires pour les HAI (orange) et les VHC+ (bleu). Dans le bas, les épitopes conformationnels trouvés par immunoprécipitation (lignes) ou par « phage display » (boîtes). a) PLTLAETV (aa 451-458) ; b) RLPKNTPE (aa 424-431) ; c) LQEGLRRA (aa 440-447) ; d) NTPEEKD (aa 428-434) ; e) LQEGLRRA (aa 440-447) ; f) APRRQLP (aa 130-139, 155, 160) ; g) QPQTAWs (aa 150-164) ; h) SGSIPSG (aa 164-171)

Comme nous le savons déjà pour la réponse immunitaire normale, les anticorps « évoluent » dans le temps et la réponse contre leur antigène s'affine. Cet affinement se fait via plusieurs mécanismes, telles que les hypermutations somatiques mais aussi par un phénomène d'étalement d'épitope (« epitope spreading »). Ce dernier entraîne la formation de nouveaux anticorps qui sont dirigés contre d'autres épitopes sur la même protéine. Le fait que les anti-LC1 dans l'HAI et dans l'infection par le VHC sont polyclonaux et dirigés contre des épitopes conformationnels et linéaires porte à croire que ces autoanticorps sont la conséquence d'une exposition répétée à l'antigène et d'une activation par ce dernier (« antigen driven response »). La formation des autoanticorps anti-LC1 pourrait être la conséquence d'un phénomène d'étalement d'épitope, où le développement d'un anticorps contre un seul épitope initie et étend une réponse immunitaire contre la protéine entière.

L'identification précise des épitopes conformationnels est complexe. Récemment, une nouvelle technique a été développée soit le « phage display ». Cette technique permet d'identifier des épitopes conformationnels (147, 148). Elle consiste en une banque de phages qui expriment de façon aléatoire une série de sept acides aminés à leur surface. Puisqu'ils font partie d'une protéine, ces acides aminés sont repliés et peuvent reproduire un épitope conformationnel. Ces épitopes conformationnels identifiés sont appelés mimotopes car ils recréent des épitopes sans pour autant avoir la même séquence d'acides aminés. Les épitopes recréés par ces mimotopes sont ensuite localisés sur la protéine d'intérêt afin de situer la région spécifique reconnue par l'anticorps. À l'aide de cette technique, cinq mimotopes reconnus par les anti-LC1 chez les patients VHC+ ont été identifiés et comparés à la structure tridimensionnelle de FTCD. Malheureusement, seulement la structure de la portion formiminotransférase de FTCD a été cristallographiée; conséquemment, seulement trois des cinq mimotopes ont pu être superposés à cette structure.

Un des mimotopes identifiés possède la séquence d'a.a. APRRQLP. Il est similaire à la région des acides aminés 130 à 139 de FTCD. Deux acides aminés (glutamine et proline) qui étaient absents de la région 130 à 139 ont été retrouvés à proximité aux positions 155

et 160. Ces acides aminés (APRRQLP) étaient tous contenus dans un rayon de 10Å et exposés à la surface de la protéine. Ces deux critères (proximité et exposition à la surface) sont des caractéristiques typiques d'un épitope (147). Deux autres mimotopes, soit les séquences d'a.a. QPQTAWS et SGSIPSG, étaient similaires aux régions des acides aminés 150 à 164 et 164 à 171 de la FTCD. Les acides aminés 150 à 171 de la FTCD forment une boucle et sont exposés à la surface de la protéine. Les boucles sont des structures immunogéniques des protéines et sont souvent la cible d'anticorps (149). Cette structure particulière ainsi que le fait d'avoir localisé deux mimotopes dans la région des a.a. 150 à 171 suggère qu'il s'agit d'une région immunogénique de la FTCD.

D'autre part, un autre mimotope montre une similarité avec la portion cyclodéaminase de la FTCD. Le mimotope représenté par les a.a. SSSLFLQ est similaire aux a.a. SSSL, à la portion 519 à 522 de la FTCD. Cette observation est intéressante puisque, dans l'HAI de type II, un épitope linéaire discontinu a été trouvé dans cette région et pour lequel les acides aminés SSSL sont essentiels à la réactivité des autoanticorps (86). La portion FLQ serait donc possiblement la portion manquante de cet épitope discontinu. Cette hypothèse pourrait être validée par la localisation de ces acides aminés sur la protéine lorsque la structure tridimensionnelle de la cyclodéaminase sera obtenue.

Conclusions

La présente étude montre que la présence d'autoanticorps anti-LC1 et anti-SLA/LP est aussi fréquente que les anti-LKM1 chez les patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C. L'association particulière de ces autoanticorps porte à croire que l'hépatite autoimmune et l'infection chronique par le VHC partageraient les mêmes mécanismes qui sous-tendent l'apparition de ces marqueurs d'autoimmunité. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à l'origine de ceux-ci ; un mimétisme moléculaire, une modulation particulière du système immunitaire ou une libération d'autoantigène via la destruction chronique des hépatocytes.

L'hypothèse d'un mimétisme moléculaire entre le VHC et les autoantigènes a été étudiée. Dernièrement, l'équipe de Kerkar *et al.* ont rapporté une réaction croisée des anti-LKM1 entre le P450 2D6, la protéine NS5 du VHC et la protéine UL98 de cytomégalovirus chez des patients infectés chroniquement par le VHC (141). Toutefois, cette hypothèse reste à être démontrée et n'explique pas l'apparition de plus d'un autoanticorps.

Une autre hypothèse est que le virus de l'hépatite C module le système immunitaire. Dans un environnement immunologique particulier et un fond génétique qui rend les individus susceptibles à développer une autoimmunité, les protéines du soi pourraient être présentées de façon à générer des autoanticorps. Cette hypothèse est appuyée par l'observation que le VHC est en mesure d'infecter les lymphocytes B (150). Toutefois, les conséquences fonctionnelles de l'infection des lymphocytes B ne sont pas connues.

D'autre part, la seule libération d'autoantigènes par la destruction chronique des hépatocytes ne peut expliquer l'apparition de ces autoanticorps. En effet, aucune autre pathologie hépatique où il y a destruction chronique des hépatocytes présente des autoanticorps anti-LC1, anti-SLA/LP et/ou anti-LKM1. La production de ces autoanticorps serait donc due à des mécanismes spécifiques d'autoimmunité.

Les autoanticorps spécifiques de l'hépatite autoimmune considérés dans cette étude, soit les anti-LKM1, les anti-LC1 et les anti-SLA/LP, sont tous dirigés contre des constituants intracellulaires. En effet, aucun des autoantigènes mentionnés n'est exprimé à la surface des cellules, et par conséquent ils ne sont pas exposés aux autoanticorps circulants. De ce fait, les autoanticorps marqueurs de l'hépatite autoimmune ne sont pas vus comme pathogéniques. Cette caractéristique est extrapolable aux anti-LKM1, anti-LC1 et anti-SLA/LP présent dans l'infection chronique au virus de l'hépatite C. Ces derniers devraient donc être considérés comme marqueurs d'une autoimmunité sous-jacente à l'infection. Cette autoimmunité pourrait aggraver les symptômes ou interférer avec le traitement de l'infection. Ce traitement, consistant en l'administration d' α -interféron, stimule le système immunitaire et pourrait aggraver l'atteinte hépatique en présence d'une autoimmunité sous-jacente. L'impact clinique de la présence des anti-LC1 et/ou des anti-SLA/LP chez des patients infectés par le VHC demeure à déterminer et pourrait apporter des réponses supplémentaires quant au rôle de ces autoanticorps dans l'atteinte chronique au foie.

Références

1. Janeway Charles A, Travers Paul, Walport Mark, Shlomchik Mark J. Immunobiology. fifth ed. New York: Garland Publishing, 2001: 732.
2. Benjamini E, Coico R, Sunshine G. Immunology: A Short course fourth Edition: Edition Wiley-Liss, 2000: 498.
3. Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol* 2003;4:503-505.
4. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2002;2:11-19.
5. James LC, Roversi P, Tawfik DS. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science* 2003;299:1362-1367.
6. Mackay IR. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. *Bmj* 2000;321:93-96.
7. Goodnow CC. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2264-2271.
8. Chatenoud L, Salomon B, Bluestone JA. Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev* 2001;182:149-163.
9. Goldschneider I, Cone RE. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. *Trends Immunol* 2003;24:77-81.
10. Mackay IR. The "Autoimmune diseases" 40th anniversary. *Autoimmun Rev* 2002;1:5-11.
11. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 2001;7:899-905.
12. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001;345:340-350.
13. Alvarez F: Autoimmune Hepatitis. In: Suchy FJ, ed. *Liver Disease in Children*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 429-441.
14. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001;2:777-780.
15. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M, et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1995;1:1279-1283.
16. Beagley KW, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:13-22.
17. Chaouat G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. *Clin Exp Immunol* 2003;131:393-395.
18. Croy BA. Where now for the Th1/Th2 paradigm of the gestational uterus? *J Reprod Immunol* 2001;51:1-2.
19. Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4371-4378.

20. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 1995;9:284-292.
21. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:37-45.
22. Di Rosa F, Barnaba V. Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunol Rev* 1998;164:17-27.
23. Alvarez F, Bernard O, Homberg JC, Kreibich G. Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1985;161:1231-1236.
24. Wucherpfennig KW. Structural basis of molecular mimicry. *J Autoimmun* 2001;16:293-302.
25. Hausmann S, Wucherpfennig KW. Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens. *Curr Opin Immunol* 1997;9:831-838.
26. Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 1999;341:2068-2074.
27. James JA, Harley JB. B-cell epitope spreading in autoimmunity. *Immunol Rev* 1998;164:185-200.
28. Lo Conte L, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 1999;285:2177-2198.
29. Enshell-Seijffers D, Denisov D, Groisman B, Smelyanski L, Meyuhas R, Gross G, Denisova G, et al. The mapping and reconstitution of a conformational discontinuous B-cell epitope of HIV-1. *J Mol Biol* 2003;334:87-101.
30. Ang CW, Jacobs BC, Laman JD. The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol* 2004;25:61-66.
31. Mamula MJ. Epitope spreading: the role of self peptides and autoantigen processing by B lymphocytes. *Immunol Rev* 1998;164:231-239.
32. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992;358:155-157.
33. Elefsiniotis IS, Diamantis ID, Dourakis SP, Kafiri G, Pantazis K, Mavrogiannis C. Anticardiolipin antibodies in chronic hepatitis B and chronic hepatitis D infection, and hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. Relationship with portal vein thrombosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:721-726.
34. Bonnet F, Pineau JJ, Taupin JL, Feyler A, Bonarek M, de Witte S, Bernard N, et al. Prevalence of cryoglobulinemia and serological markers of autoimmunity in human immunodeficiency virus infected individuals: a cross-sectional study of 97 patients. *J Rheumatol* 2003;30:2005-2010.
35. Zauli D, Cassani F, Bianchi FB. Auto-antibodies in hepatitis C. *Biomed Pharmacother* 1999;53:234-241.
36. Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Selleri L, Volta U, Zauli D, et al. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990;335:258-259.

37. Yamamoto AM, Cresteil D, Homberg JC, Alvarez F. Characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM1) from hepatitis C virus-positive and -negative sera. *Gastroenterology* 1993;104:1762-1767.
38. Herzog D, Yamamoto AM, Jara P, Maggiore G, Sarles J, Alvarez F. Sera of children with hepatitis C infection and anti-liver-kidney microsome-1 antibodies recognize different CYP2D6 epitopes than adults with LKM+/HCV+ sera. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:551-555.
39. Reuben A. A sheep in wolf's clothing. *Hepatology* 2003;38:1596-1601.
40. zum Buschenfelde KH. Autoimmune hepatitis: "Hepatitis sui generis". *J Hepatol* 2003;38:130-135.
41. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993;18:998-1005.
42. Joske RA, King WE. The L.E.-cell phenomenon in active chronic viral hepatitis. *Lancet* 1955;269:477-480.
43. Cowling DC, Mackay IR, Taft LI. Lupoid hepatitis. *Lancet* 1956;271:1323-1326.
44. Holborow EJ, Asherson GL, Johnson GD, Barnes RD, Carmichael DS. Antinuclear factor and other antibodies in blood and liver diseases. *Br Med J* 1963;5331:656-658.
45. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-938.
46. Alvarez F. Autoimmune hepatitis in children. Switzerland: Kluwer academic publishers, 2000: 93-98.
47. Duclos-Vallee JC, Johanet C, Sebah M, Samuel D, Yamamoto AM. Hépatites auto-immunes. *Ann Med Interne (Paris)* 2001;152:371-382.
48. Martini A, Lorini R, Zanaboni D, Ravelli A, Burgio RG. Frequency of autoantibodies in normal children. *Am J Dis Child* 1989;143:493-496.
49. Toh BH. Smooth muscle autoantibodies and autoantigens. *Clin Exp Immunol* 1979;38:621-628.
50. Lunel F, Abuaf N, Frangeul L, Gripon P, Perrin M, Le Coz Y, Valla D, et al. Liver/kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992;16:630-636.
51. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer zum Buschenfelde KH. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1987;1:292-294.
52. Kanzler S, Weidemann C, Gerken G, Lohr HF, Galle PR, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:635-640.
53. Vitozzi S, Djilali-Saiah I, Lapierre P, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2002;35:485-492.
54. McFarlane IG: Definition and classification of autoimmune hepatitis 1999 (on behalf of the International Autoimmune Hepatitis Group). In: *Immunology and Liver*: Kluwer academic Publisher, 2000; 57-68.

55. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:223-243.
56. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:99-103.
57. Milkiewicz P, Hubscher SG, Skiba G, Hathaway M, Elias E. Recurrence of autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Transplantation* 1999;68:253-256.
58. Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK, Everhart J, et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology* 1998;28:638-645.
59. Mackay IR, Morris PJ. Association of autoimmune active chronic hepatitis with HL-A1,8. *Lancet* 1972;2:793-795.
60. Strettell MD, Donaldson PT, Thomson LJ, Santrach PJ, Moore SB, Czaja AJ, Williams R. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1997;112:2028-2035.
61. Doherty DG, Donaldson PT, Underhill JA, Farrant JM, Duthie A, Mieli-Vergani G, McFarlane IG, et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1994;19:609-615.
62. Seki T, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Kondo T, Hino K, Mizuki N, et al. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology* 1992;103:1041-1047.
63. Vazquez-Garcia MN, Alaez C, Olivo A, Debaz H, Perez-Luque E, Burguete A, Cano S, et al. MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998;28:985-990.
64. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Farias AQ, Palacios SA, et al. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1906-1913.
65. Fainboim L, Marcos Y, Pando M, Capucchio M, Reyes GB, Galoppo C, Badia I, et al. Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1*1301) haplotype. *Hum Immunol* 1994;41:146-150.
66. Marcos Y, Fainboim HA, Capucchio M, Findor J, Daruich J, Reyes B, Pando M, et al. Two-locus involvement in the association of human leukocyte antigen with the extrahepatic manifestations of autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology* 1994;19:1371-1374.
67. Djilali-Saiah I, Renous R, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. Linkage disequilibrium between HLA class II region and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *J Hepatol* 2004;40:904-909.
68. Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev* 2000;174:250-259.
69. Czaja AJ. Understanding the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1224-1231.

70. Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000;31:49-53.
71. Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 2001;62:1356-1362.
72. Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;117:645-652.
73. Senaldi G, Portmann B, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis. *Arch Dis Child* 1992;67:1447-1453.
74. Vergani D, Mieli-Vergani G: The role of T cells in autoimmune hepatitis. In: *Immunology and Liver*: Kluwer Academic Publisher, 2000; 133-136.
75. Czaja AJ, Sievers C, Zein NN. Nature and behavior of serum cytokines in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2000;45:1028-1035.
76. Wen L, Peakman M, Lobo-Yeo A, McFarlane BM, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. T-cell-directed hepatocyte damage in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1990;336:1527-1530.
77. Lohr H, Treichel U, Poralla T, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH. Liver-infiltrating T helper cells in autoimmune chronic active hepatitis stimulate the production of autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor in vitro. *Clin Exp Immunol* 1992;88:45-49.
78. Rizzetto M, Swana G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 1973;15:331-344.
79. Rizzetto M, Bianchi FB, Doniach D. Characterization of the microsomal antigen related to a subclass of active chronic hepatitis. *Immunology* 1974;26:589-601.
80. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, Poupon R, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987;7:1333-1339.
81. Gueguen M, Yamamoto AM, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver-kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db1. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:542-547.
82. Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O, Clerc FF, Alvarez F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol* 1993;23:1105-1111.
83. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988;8:1662-1666.
84. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998;42:721-726.
85. Lapiere P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:643-649.

86. Lapiere P, Johanet C, Alvarez F. Characterization of the B cell response of patients with anti-Liver Cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis. *Eur J Immunol* 2003;33:1869-1878.
87. Muratori L, Sztul E, Muratori P, Gao Y, Ripalti A, Ponti C, Lenzi M, et al. Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. *Hepatology* 2001;34:494-501.
88. MacKenzie RE, Aldridge M, Paquin J. The bifunctional enzyme formiminotransferase-cyclodeaminase is a tetramer of dimers. *J Biol Chem* 1980;255:9474-9478.
89. Renous R, Lapiere P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. Characterization of the antigenicity of the formiminotransferase-cyclodeaminase in type 2 autoimmune hepatitis. *Exp Cell Res* 2004;292:332-341.
90. Murley LL, MacKenzie RE. The two monofunctional domains of octameric formiminotransferase-cyclodeaminase exist as dimers. *Biochemistry* 1995;34:10358-10364.
91. Mao Y, Vyas NK, Vyas MN, Chen DH, Ludtke SJ, Chiu W, Quioco FA. Structure of the bifunctional and Golgi-associated formiminotransferase cyclodeaminase octamer. *Embo J* 2004;23:2963-2971.
92. Findlay WA, MacKenzie RE. Renaturation of formiminotransferase-cyclodeaminase from guanidine hydrochloride. Quaternary structure requirements for the activities and polyglutamate specificity. *Biochemistry* 1988;27:3404-3408.
93. Kohls D, Sulea T, Purisima EO, MacKenzie RE, Vrieling A. The crystal structure of the formiminotransferase domain of formiminotransferase-cyclodeaminase: implications for substrate channeling in a bifunctional enzyme. *Structure Fold Des* 2000;8:35-46.
94. Stechemesser E, Klein R, Berg PA. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1993;18:1-9.
95. Klein R, Berg PA. Glutathione S-transferase as a major autoantigen in anti-SLA-positive autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:1015-1016.
96. Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000;355:1510-1515.
97. Gelpi C, Sontheimer EJ, Rodriguez-Sanchez JL. Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9739-9743.
98. Volkmann M, Martin L, Baurle A, Heid H, Strassburg CP, Trautwein C, Fiehn W, et al. Soluble liver antigen: isolation of a 35-kd recombinant protein (SLA-p35) specifically recognizing sera from patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2001;33:591-596.
99. Wesierska-Gadek J, Grimm R, Hitchman E, Penner E. Members of the glutathione S-transferase gene family are antigens in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1998;114:329-335.
100. Wachter B, Kyriatsoulis A, Lohse AW, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH, Manns M. Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies. *J Hepatol* 1990;11:232-239.

101. 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;292:767-770.
102. 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;244:359-362.
103. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364.
104. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:5-19.
105. Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J* 2001;20:3840-3848.
106. 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;101:7270-7274.
107. Wang JT, Sheu JC, Lin JT, Wang TH, Chen DS. Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 1992;166:1167-1169.
108. Bandy U. Hepatitis C virus (HCV): a silent epidemic. *Med Health R I* 1999;82:223-224.
109. Dhillon AP, Dusheiko GM. Pathology of hepatitis C virus infection. *Histopathology* 1995;26:297-309.
110. Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 10):2397-2410.
111. Purcell RH: Hepatitis C Virus (Flaviviridae). In: Granoff A, ed. *Encyclopedia of Virology*. Volume Volume 1. San Diego: Academic Press, 1999; 657-663.
112. Cotran R S, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th Edition ed: W.B. Saunders Compagny, 1999: 1425.
113. Fishman JA, Rubin RH, Koziel MJ, Periera BJ. Hepatitis C virus and organ transplantation. *Transplantation* 1996;62:147-154.
114. Bogdanos DP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Virus, liver and autoimmunity. *Dig Liver Dis* 2000;32:440-446.
115. Hofmann WP, Herrmann E, Kronenberger B, Merkwirth C, Welsch C, Lengauer T, Zeuzem S, et al. Association of HCV-related mixed cryoglobulinemia with specific mutational pattern of the HCV E2 protein and CD81 expression on peripheral B lymphocytes. *Blood* 2004;104:1228-1229.
116. Cocquerel L, Kuo CC, Dubuisson J, Levy S. CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *J Virol* 2003;77:10677-10683.
117. Bortolotti F, Vajro P, Balli F, Giacchino R, Crivellaro C, Barbera C, Cataleta M, et al. Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996;25:614-620.
118. Parez N, Herzog D, Jacqz-Aigrain E, Homberg JC, Alvarez F. Study of the B cell response to cytochrome P450IID6 in sera from chronic hepatitis C patients. *Clin Exp Immunol* 1996;106:336-343.

119. Lapiere P, Herzog D., Alvarez F. Autoepitopes in Hepatitis C: Edizioni Minerva Medica, 1997: 460-462.
120. Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J, Melief CJ, et al. Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *J Exp Med* 1999;190:169-176.
121. Beland K, Lapiere P, Marceau G, Alvarez F. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Autoimmun* 2004;22:159-166.
122. Vitozzi S, Lapiere P, Djilali-Saiah I, Marceau G, Beland K, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection. *Autoimmunity* 2004;37:217-222.
123. Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Muratori P, Giostra F, Francesconi R, Muratori L, et al. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. *Hepatology* 1997;26:561-566.
124. Czaja AJ, Magrin S, Fabiano C, Fiorentino G, Diquattro O, Craxi A, Pagliaro L. Hepatitis C virus infection as a determinant of behavior in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995;40:33-40.
125. Fusconi M, Lenzi M, Ballardini G, Miniero R, Cassani F, Zauli D, Bianchi FB. Anti-HCV testing in autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1990;336:823.
126. Quaranta JF, Tran A, Regnier D, Letestu R, Beusnel C, Fuzibet JG, Thiers V, et al. High prevalence of antibodies to hepatitis C virus (HCV) in patients with anti-thyroid autoantibodies. *J Hepatol* 1993;18:136-138.
127. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartwell P, Couser WG, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993;328:465-470.
128. Divano MC, Parodi A, Rebora A. Anti-GOR antibodies in lichen planus. *Dermatology* 1994;188:205-206.
129. Seelig R, Renz M, Bunger G, Schroter H, Seelig HP. Anti-LKM-1 antibodies determined by use of recombinant P450 2D6 in ELISA and western blot and their association with anti-HCV and HCV-RNA. *Clin Exp Immunol* 1993;92:373-380.
130. Reddy KR, Krawitt EL, Homberg JC, Jeffers LJ, de Medina M, Chastenay B, Poupon R, et al. Absence of anti-LKM-1 antibody in hepatitis C viral infection in the United States of America. *J Viral Hepat* 1995;2:175-179.
131. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, Mowat AP, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997;25:541-547.
132. Lenzi M, Manotti P, Muratori L, Cataleta M, Ballardini G, Cassani F, Bianchi FB. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995;36:749-754.
133. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Manotti P, Lenzi M, Cassani F, Bianchi FB. Detection of anti-liver cytosol antibody type 1 (anti-LC1) by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting: comparison of different techniques. *J Immunol Methods* 1995;187:259-264.

134. Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 1986;322:747-748.
135. Van Regenmortel MH. The conformational specificity of viral epitopes. *FEMS Microbiol Lett* 1992;79:483-487.
136. Codoner-Franch P, Ordinana V, Gasco E, Villalba J, Alvarez F. Anti-rat liver microsomal and cytosolic antibodies in hepatitis C virus infection. *Autoimmunity* 1994;17:89-97.
137. Ballot E, Homberg JC, Johanet C. Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis. *J Hepatol* 2000;33:208-215.
138. Nishioka M, Morshed SA, Parveen S, Kono K, Matsuoka H, Manns MP. Antibodies to P450IID6, SLA, PDH-E2 and BCKD-E2 in Japanese patients with chronic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:862-868.
139. Yamamoto AM, Johanet C, Duclos-Vallee JC, Bustarret FA, Alvarez F, Homberg JC, Bach JF. A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type-2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay. *Clin Exp Immunol* 1997;108:396-400.
140. Van Regenmortel MHV. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods* 1996;9:465-472.
141. Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, Bianchi F, et al. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003;170:1481-1489.
142. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991;88:1370-1378.
143. Marceau G, Lapierre P, Béland K, Soudeyns H, Alvarez F. LKM1 autoantibodies in hepatitis C chronic infection: a case of molecular mimicry? 2004:in preparation.
144. Maran R, Dueymes M, Le Corre R, Renaudineau Y, Shoenfeld Y, Youinou P. IgG subclasses of human autoantibodies. *Ann Med Interne (Paris)* 1997;148:29-38.
145. Peakman M, Lobo-Yeo A, Mieli-Vergani G, Davies ET, Mowat AP, Vergani D. Characterization of anti-liver kidney microsomal antibody in childhood autoimmune chronic active hepatitis: evidence for IgG1 subclass restriction, polyclonality and non cross-reactivity with hepatocyte surface antigens. *Clin Exp Immunol* 1987;69:543-549.
146. Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein. *J Immunol Methods* 2002;262:103-110.
147. Rowley MJ, Scealy M, Whisstock JC, Jois JA, Wijeyewickrema LC, Mackay IR. Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display. *J Immunol* 2000;164:3413-3419.

148. Osman AA, Uhlig H, Thamm B, Schneider-Mergener J, Mothes T. Use of the phage display technique for detection of epitopes recognized by polyclonal rabbit gliadin antibodies. *FEBS Lett* 1998;433:103-107.
149. Olcese VA, Chen Y, Schlegel R, Yuan H. Characterization of HPV16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformational epitope. *BMC Microbiol* 2004;4:29.
150. Ducoulombier D, Roque-Afonso AM, Di Liberto G, Penin F, Kara R, Richard Y, Dussaix E, et al. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* 2004;39:817-825.