

Université de Montréal

**Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire
dirigée contre ARFP et cartographie des épitopes du
génotype 3a lors de l'infection au virus de l'hépatite C**

par

Christian Drouin

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de M. Sc.

en microbiologie et immunologie

janvier, 2009

© Christian Drouin, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre ARFP et cartographie
des épitopes du génotype 3a lors de l'infection au virus de l'hépatite C

présentée par :
Christian Drouin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

D^{re} Petronela Ancuta, président-rapporteur
D^{re} Naglaa Shourky, directrice de recherche
D^r Hugo Soudeyns, membre de jury

Résumé

L'interféron- α pegylé en combinaison avec la ribavirin est le seul traitement approuvé pour le traitement de l'infection au virus de l'hépatite C (VHC). L'efficacité est de 50-75%, la thérapie est coûteuse et induit beaucoup d'effets secondaires. Il est impératif d'avoir une meilleure compréhension de la pathogenèse du VHC afin de développer des traitements plus efficaces ou un vaccin. À cette fin, notre approche est de caractériser la réponse immunitaire cellulaire induite par ARFP, un antigène nouveau et conservé chez le VHC, et de cartographier les épitopes de la réponse immunitaire cellulaire d'un patient infecté au génotype 3a ayant résolu spontanément. Le génotype 3a, étant prévalant chez les utilisateurs de drogues intraveineuses (IDUs) constitue 60% des nouvelles infections. Peu d'épitopes furent identifiés auparavant pour ce génotype, ce qui rend l'étude de la réponse immunitaire difficile chez cette population.

Dans cette étude, pour la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre ARFP, nous n'avons pas observé de différence significative entre les patients ayant résolu spontanément comparativement avec ceux ayant développé une infection persistante. Ceci suggère fortement que ARFP ne joue pas un rôle majeur lors de la résolution de l'infection aiguë au VHC.

Pour la caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire chez un des patients infectés au génotype 3a, nous avons identifié et caractérisé 5 épitopes spécifiquement reconnus par des lymphocytes T, CD3+, CD4+ et CD8- : E2₅₀₄₋₅₂₁, NS3₁₀₆₄₋₁₀₈₁, NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, NS5a₂₀₇₄₋₂₀₉₁, NS5b₂₄₂₁₋₂₄₃₆. Nous avons comparé avec ceux connus pour le génotype 1a. Nous avons identifié 4 nouveaux épitopes. Enfin, l'épitope NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, identifié auparavant, pourrait s'avérer être un candidat intéressant dans la mise au point d'un vaccin à base de peptides immunogéniques contre le VHC.

Mots-clés : ARFP, épitopes, génotype 3a, hépatite C, réponse immunitaire cellulaire.

Abstract

Interferon- α combined with ribavirin is the only approved treatment of hepatitis c virus (HCV) infection. The efficiency is between 50-75%, the therapy is expensive and has numerous side-effects. It is imperative to have a better understanding of HCV pathogenesis to develop better treatments or a vaccine. To this end, our approach is to characterize the immune cellular response against ARFP, a newly identified and conserved antigen of HCV; and to characterize and fine map cellular immune response of a patient infected with genotype 3a that spontaneously resolved. Genotype 3a is most prevalent in intravenous drug users (IDUs) where nearly 60% of all new HCV infections happen. Very few epitopes are known for genotype 3a which makes it difficult to study HCV-specific immune responses in this population.

In this study, for ARFP specific cellular responses, we observed no significant difference between patients that spontaneously resolved compared to those who developed persistent infection. This strongly suggests that ARFP does not play a major role in acute HCV infection resolution.

For the characterization of immune cellular response developed against genotype 3a, we identified and characterized 5 epitopes recognized by lymphocytes T, CD3+, CD4+, CD8-: E2₅₀₄₋₅₂₁, NS3₁₀₆₄₋₁₀₈₁, NS4B₁₇₅₉₋₁₇₇₆, NS5A₂₀₇₄₋₂₀₉₁, NS5B₂₄₂₁₋₂₄₃₆. We compared them with epitopes known for genotype 1a. We have identified 4 novel epitopes. Finally, NS4B₁₇₅₉₋₁₇₇₆, previously identified, could be a good candidate in the development of a peptide based vaccine against HCV.

Keywords : ARFP, epitopes, genotype 3a, hepatitis C, cellular immune response

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xi
Remerciements	xv
Avant-propos	xvi
Introduction	1
CHAPITRE 1. Revue de la littérature	4
1.1. Génotype, sous-type et quasi-espèce.....	4
1.1. Morphogénèse et Cycle de réplication.....	7
1.1.1. Morphogénèse	7
1.1.1.1. Organisation génomique	7
1.1.1.2. Protéines virales	9
1.1.2. Cycle de réplication.....	11
1.2. « Alternative Reading Frame Protein ».....	14
1.2.1. Historique.....	14
1.2.2. Expression et fonction.....	15
1.2.3. État des connaissances sur la réponse immunitaire contre ARFP.....	18
1.2.3.1. Réponse immunitaire humorale contre ARFP	18
1.2.3.2. Réponse immunitaire cellulaire contre ARFP.....	19
1.3. La réponse immunitaire contre le VHC	20
1.3.1. La réponse innée	20
1.3.1.1. Les récepteurs toll-like (TLR) et le VHC	20
1.3.1.2. Effet du VHC sur les cellules dendritiques et NK	23
1.3.2. La réponse adaptative.....	25

1.3.2.1.	La réponse humorale	25
1.3.2.2.	La réponse cellulaire	26
1.3.3.	Persistance ou guérison	27
1.4.	Hypothèse et objectifs du projet de maîtrise	29
CHAPITRE 2. Matériel et méthodes		32
2.1	Source des échantillons de PBMCs humains : Cohorte St-Luc	32
2.2	Préparation des cellules	35
2.3	Préparation des solutions de peptides	35
2.4	Préparation des groupes de peptides	36
2.5	ELISpot anti-interféron- γ effectué sur les PBMCs humaines	39
2.6	ELISpot anti-interféron- γ effectué sur les lignées de clones T	40
2.7	Génération de lignées lymphocytaires T	43
2.8	Purification des lignées lymphocytaires T par sélection négative	43
2.9	Culture cellulaire des BLCLs, des lignées lymphocytaires et des clones T	44
2.10	Criblage des lignées lymphocytaires par essai de prolifération à la thymidine ^3H	45
2.11	Cytométrie en flux, anticorps et réactifs	47
2.12	Marquage intracellulaire de l'interféron- γ des clones ou lignées lymphocytaires	47
2.13	Essai de restriction du CMH	48
2.14	Analyses statistiques	48
CHAPITRE 3. Résultats		50
3.1	Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire contre la protéine ARFP ...	50
3.1.1	Criblage de la réponse immunitaire cellulaire contre ARFP avec des groupes de peptides	51
3.1.2	Criblage de la réponse immunitaire contre ARFP utilisant ARFP mut $\Delta 11$ recombinante	55
3.1.3	Création de lignées cellulaires et isolation de clones spécifiques contre ARFP mut $\Delta 11$	57

3.1.4	Détermination de la séquence de l'épitope et de la molécule du CHM II impliquée dans la présentation antigénique	60
3.2	Cartographie haute résolution des épitopes retrouvés lors de l'infection au VHC génotype 3a	63
3.2.1	Criblage de la réponse immunitaire	63
3.2.2	Génération de lignées lymphocytaires spécifiques et isolation de clones spécifiques contre les antigènes du VHC	65
3.2.3	Cartographie des épitopes reconnus pas les clones T CD4+	67
3.2.4	Caractérisation de la restriction du CMH II et des allèles impliqués dans la présentation des épitopes	68
3.2.5	Analyse du niveau de conservation des épitopes entre le génotype 1a et 3a	72
CHAPITRE 4. Discussion		73
4.1	Sommaire des résultats	73
4.2	La réponse immunitaire cellulaire contre ARFP lors de la phase aigüe de l'infection au VHC	75
4.2.1	ARFP n'est pas immunogénique, ni immunodominante, ni importante dans la résolution de l'infection au VHC lors de la phase aigüe	75
4.3	Cartographie haute résolution des épitopes retrouvés lors de l'infection au VHC 3a	79
4.3.1	La réponse immunitaire cellulaire du patient 4757-HAJX est multispécifique	79
4.3.2	Les épitopes définis à partir du patient 4757-HAJX au VHC, génotype 3a, se retrouvent principalement dans les protéines non structurales (NS) du VHC	80
4.3.3	L'allèle de la molécule DR impliqué dans la présentation antigénique des épitopes non structuraux est DRB1*070101/070102 et pour l'épitope structural l'allèle est DRB1*090102	81

4.3.3	NS4b ₁₇₅₉₋₁₇₇₆ , un candidat potentiel dans la mise au point d'un vaccin; E2 ₅₀₄₋₅₂₁ , NS3 ₁₀₆₄₋₁₀₈₁ , NS5a ₂₀₇₄₋₂₀₉₁ , NS5b ₂₄₂₁₋₂₄₃₆ , de nouveaux épitopes	82
4.4	Conclusion.....	84
4.4.1	Lors de la phase aigüe, ARFP n'est pas importante dans la résolution de l'infection au VHC.....	84
4.4.2	Pour le génotype 3a du VHC, l'épitope NS4b ₁₇₅₉₋₁₇₇₆ , pourrait être un bon candidat dans la préparation d'un vaccin, alors que les épitopes E2 ₅₀₄₋₅₂₁ , NS3 ₁₀₆₄₋₁₀₈₁ , NS5a ₂₀₇₄₋₂₀₉₁ , NS5b ₂₄₂₁₋₂₄₃₆ , sont des découvertes.....	84
4.5	Perspective	85
4.5.1	ARFP.....	Erreur ! Signet non défini.
4.5.2	Cartographie haute résolution des épitopes du VHC génotype 3a.....	86
	Bibliographie.....	87

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des patients ayant participé à l'étude de la réponse immunitaire cellulaire contre ARFP	33
Tableau II : Organisation des groupes de peptides du génotype 1a, H77	37
Tableau III : Organisation des groupes de peptides du génotype 3a, K3/650.....	38
Tableau V : Résultats de l'essai de prolifération à la thymidine ³ H	66
Tableau VI : Conservation des épitopes entre les génotypes et allèles HLA-DR impliqués	71

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la prévalence des différents génotypes du VHC dans le monde et en Amérique du Nord.....	5
Figure 2 : Arbre phylogénétique du VHC représentant les principaux génotypes, 1 à 6 et les principaux sous-types.....	6
Figure 3 : Organisation du génome du VHC	8
Figure 4 : Cycle de réplication du VHC.....	13
Figure 5 : Familles des protéines ARFP	15
Figure 6 : Schéma d'identification et de suivi des infections aiguës au VHC.....	34
Figure 7 : ELISpot anti-interféron- γ	42
Figure 8 : Caractéristiques longitudinales de la production d'IFN- γ	54
Figure 9 : Alignement des séquences de ARFP, génotype 1a isolat H77 et de ARFP mut8 Δ 11, isolat TVC33.	56
Figure 10 : Détection de l'IFN- γ au mois 2, 4 et 15 lors de l'infection au VHC, génotype 2b pour le patient 4545-HABT.	57
Figure 11 : Détection de l'IFN- γ des clones T, CD4+ ARFP mut8 Δ 11 spécifiques	59
Figure 12 : Criblage des épitopes reconnus par les clones 2 et 5.....	61
Figure 13 : Restriction de la molécule du CMH II impliquée dans la reconnaissance de ARFP mut8 Δ 11 chez les clones T CD4+ 2 et 5.....	62
Figure 15 : ELISpot du patient 4757-HAJX. Criblage de la réponse immunitaire cellulaire contre le génotype 3a.	64
Figure 16 : Cartographie de la réponse anti-VHC	67
Figure 17 : Détermination de la restriction et de l'allèle du CMH II impliqué pour chaque clone T CD4+.....	70

Liste des sigles et des abréviations

A.A., acide aminé

ARFP, « Alternative Reading Frame Protein »

ATCC, American Type Culture Collection

BD, Becton Dickinson,

BLCL, lymphocytes B immortalisés par EBV

CHUM, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

CMH, molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

CPA, cellule présentatrice d'antigènes

CTL, lymphocyte T cytotoxique effecteur

Ctrl, contrôle

DC, cellule dendritique

DMSO, diméthylsulfoxyde

EBV, virus Epstein Barr

ELISPOT, essai «*enzyme-linked immunosorbent spot*»

EtOH, éthanol

FBS, sérum bovin fœtal

FCS, sérum fœtal de veau

FITC, fluorescein isothiocyanate

g, gramme

h, heure

HLA, antigène des leucocytes humains

HS, sérum humain AB inactivé

HSA, albumine de sérum humain

IDU: utilisateur de drogues intraveineuses

IFN, interféron

IL, interleukine

ISG, gènes stimulés par l'IFN- γ

l, litre
LSPQ, laboratoire de santé publique du Québec
m, milli
M, molaire
mAb, anticorps monoclonal
min, minute
n, nano
BCIP/NBT, 5-bromo, 4-chloro, 3-indolylphosphate/nitro blue tetrazolium chloride
NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NK, cellule tueuse naturelle
NTR, région non traduite
PAMP, patron moléculaire associé aux pathogènes
PBMC, cellules mononuclées du sang périphérique
PBS, « *phosphate-buffered saline* »
PVDF, Polyfluorure de vinylidène
RE, réticulum endoplasmique
RPM, rotation par minute
R10, milieu de culture RPMI 1640, 10% FCS
R10/HS, milieu de culture RPMI 1640, 10% sérum humain inactivé
SFC, Spots forming cells
STREP-AP, streptavidine-phosphatase alcaline
T_C, lymphocytes T cytotoxiques
T_H, lymphocytes T auxiliaires
TCR, récepteur des cellules T
TLR, récepteur toll-like
U, unité
UI, unité internationale
V, volume

VHC, virus de l'hépatite C

VIH, virus de l'immunodéficience humaine.

α, alpha

β, bêta

°C, degré Celsius

δ, delta

κ, kappa

γ, gamma

μ, micro

%, pourcentage

*Il faut faire de ses rêves sa raison de vivre et
croire en soi. Tout est possible avec le
courage, la persévérance et surtout le temps.
Le temps de comprendre comment c'est
possible.*

Christian Drouin

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mes parents de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans tous les projets que j'ai entrepris, dont la réalisation de cette maîtrise en microbiologie et immunologie.

Je voudrais aussi remercier la Dre Naglaa Shoukry, ma directrice de recherche, de m'avoir donné l'opportunité de faire mes études de 2^e cycle au sein de son laboratoire, au centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) au campus de St-Luc.

J'aimerais aussi remercier les membres de la belle équipe de laboratoire que j'ai côtoyés tout au long de ma maîtrise et qui ont rendu la tâche plus facile et agréable : Mohamed Abdel Hakeem, Jennifer Aldinger, Gamal Badr, Nathalie Bédard, Hassen Kared, Sandy Pelletier, Anna Tomczyk et Myriam Troesch.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis de m'avoir accompagné, écouté et soutenu tout au long de cette aventure.

Avant-propos

Lors de mes 2 années passées au sein du laboratoire de la Dre Naglaa Shoukry, j'ai eu l'occasion de développer des essais, d'entraîner des gens à différents niveaux de leurs carrières (stagiaires, étudiants à la maîtrise, au doctorat ou encore stagiaires postdoctoraux), et de participer à des collaborations qui dépassent le cadre de ce mémoire.

D'abord durant les 6 premiers mois de ma maîtrise, j'ai travaillé à mettre au point un ELISpot « dual color », permettant la détection des populations cellulaires sécrétant de l'IFN- γ ou de l'IL-2 ou doubles positives IFN- γ /l'IL-2. Après avoir mis la technique au point, nous avons constaté que la sensibilité de la détection de la fréquence des cellules sécrétant l'IFN- γ n'était pas aussi grande que lorsque nous utilisions un autre essai permettant de ne détecter que la sécrétion de l'IFN- γ . Nous avons conclu que la capture de l'IL-2 diminuait la biodisponibilité de l'IFN- γ , ce qui avait pour effet de diminuer le seuil de détection de cette dernière cytokine. Nous avons alors procédé à l'étude en question dans ce mémoire en utilisant la technique ne détectant qu'une seule cytokine, l'IFN- γ .

J'ai aussi eu l'occasion de développer mes talents d'enseignant et de communicateur en entraînant plusieurs personnes, surtout pour les essais tels que l'ELISpot, l'essai de prolifération à la thymidine^{H3}, ainsi que la pratique de la culture cellulaire (niveau biorisque 2 et 3) : Mohamed Abdel Akim (étudiant M. Sc), Anh Hoang Ho Quan (stagiaire B. Sc), Liz Alvarez-Lajonchere (Ph D.), Pierre-Yves Babin (stagiaire), Hassen Kared (stagiaire postdoctoral), et Céline Valen (stagiaire).

Enfin, j'ai participé à 2 collaborations, une avec le Dr Dueñas-Carrera du « Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología », à la Havana, Cuba, et une autre au sein de notre laboratoire avec Sandy Pelletier, étudiante au doctorat. L'étude avec nos collaborateurs à la Havana a été publiée récemment (voir ci-bas) alors que celle en collaboration avec Sandy Pelletier est en préparation :

Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in HCV chronically infected individuals in a Phase I clinical trial. Alvarez-Lajonchere L, Shoukry NH, Grá B, Amador-Cañizares Y, Helle F, Bédard N, Guerra I, **Drouin C**, Dubuisson J, González-Horta EE, Martínez G, Marante J, Cinza Z, Castellanos M, Dueñas-Carrera S. J Viral Hepat. 2008 Oct 3

Introduction

Avant 1989, lors de transfusions sanguines, beaucoup de cas d'hépatite aigüe apparaissaient sans qu'ils soient reliés aux virus de l'hépatite A ou B. On appela la maladie causant ces cas, hépatite non-A, non-B. En 1989, l'hépatite non-A, non-B fut rebaptisée l'hépatite C, et son agent étiologique fut appelé virus de l'hépatite C (VHC), suite à son isolation par Michael Houghton, Qui-Lim Choo, et George Kuo de la Chiron Corporation, en collaboration avec le Dr D.W. Bradley du « Center for Disease Control and Prevention » (CDC) (Choo, Q.L. et al, 1989).

Le VHC, du genre des *hepacivirus* de la famille des *flaviviridae*, est un virus à ARN, d'environ 9.6 kp, à polarité positive, enveloppé, et de taille d'environ 50 nm qui se réplique dans le foie et qui est détectable dans le sérum durant les phases aigüe et chronique de l'infection. C'est un problème de santé mondial qui affecte un nombre estimé à 200 millions d'individus, une prévalence de 3% (Grakoui, A., et al, 2001; Lauer, G.M., et al, 2001; Alter, M.J., et al, 2004). Après infection, 75 à 85 % des individus développent une infection chronique qui à long terme conduit parfois à la cirrhose et augmente les probabilités de développer un cancer hépatique (Thomas D.L., et al, 2005). C'est une cause majeure des transplantations du foie (Rosen H.R., 2000).

À ce jour, le seul traitement permettant de guérir l'infection dans 50-75% des cas, selon le génotype et la charge virale lors de l'infection, est l'administration d'interféron-alpha (IFN- α) en combinaison avec la ribavirine (Manns, M.P., et al, 2001; Fried, M.W. et al, 2002). Cependant, ce traitement est couteux et engendre de nombreux effets secondaires (Masci P et al, 2003). De plus, il n'existe pas encore de vaccin contre l'hépatite C (Berzofsky J.A., et al, 2004).

On ne comprend pas encore tout de l'infection au VHC. Ce que l'on sait est que la réponse cellulaire adaptative est critique dans l'élimination du virus et que l'immunité innée aurait aussi un rôle à jouer dans la persistance ou la guérison. Plus précisément que les réponses lymphocytaires T CD8⁺ et T CD4⁺ doivent être vigoureuses et multispécifiques ; et que lorsque la réponse cellulaire T CD4⁺ n'est pas maintenue, la voie

vers l'établissement de la persistance est inévitable (Shourky N.H. et al, 2004). On pense que l'échec de l'immunité adaptative à contrôler le virus pourrait être relié à divers mécanismes de pathogenèse qui seraient mis en branle tôt lors de l'infection en interagissant avec l'immunité innée. Ceux-ci seront revus dans les pages qui suivent.

Afin de développer de meilleurs traitements et des vaccins thérapeutiques ou prophylactiques, il est essentiel d'étudier les mécanismes de pathogenèse et la réponse induite par le système immunitaire de l'hôte. Une des approches contribuant à une meilleure compréhension de la pathogenèse du VHC et à l'élaboration de stratégies de vaccination est la caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire induite par le virus. L'identification d'épitopes immunodominants et des déterminants de la réponse initiale font parties de cette caractérisation de la réponse.

L'approche expérimentale choisie ici consista dans un premier temps en l'investigation de l'importance de la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre un nouvel antigène récemment décrit chez le VHC, l' « Alternative Reading Frame Protein » (ARFP). Dans un deuxième temps, la cartographie des épitopes reconnus durant la réponse immunitaire cellulaire chez un patient infecté au VHC génotype 3a qui a résolu spontanément l'infection fut déterminée, les connaissances sur ce dernier étant moins approfondies que pour le génotype 1a.

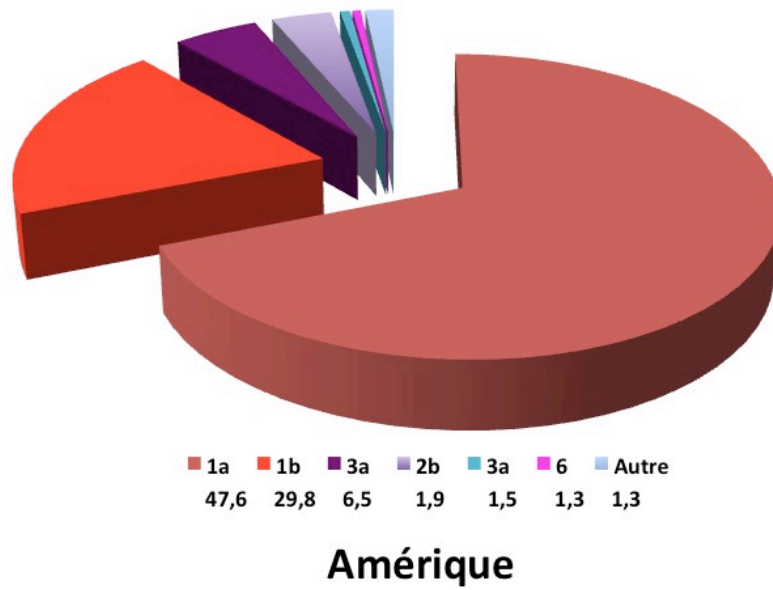
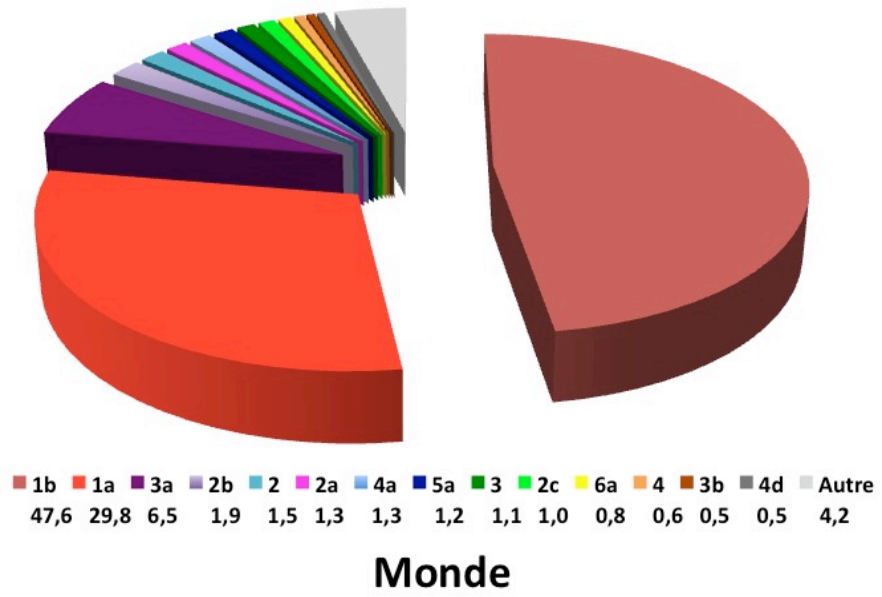
Dans ce mémoire, la première partie comporte une revue de la littérature traitant des connaissances permettant d'avoir une vue d'ensemble de la problématique entourant l'hépatite C et qui nécessaire à une bonne compréhension des résultats produits ci-après. Ensuite viennent les hypothèses et objectifs de travail. Le deuxième chapitre, matériel et méthodes, contient toutes les informations nécessaires à la reproduction des expériences. Le troisième chapitre porte sur les résultats obtenus. Enfin, le quatrième chapitre consiste en la discussion et la conclusion. Ces travaux suggèrent fortement que la réponse immunitaire cellulaire contre ARFP n'est pas importante pour la résolution de l'infection à l'hépatite C et permettent d'ouvrir la voie vers la caractérisation de la réponse immunitaire

cellulaire induite par le VHC de génotype 3a afin de mieux comprendre les différences qui existent avec le génotype 1a.

CHAPITRE 1. Revue de la littérature

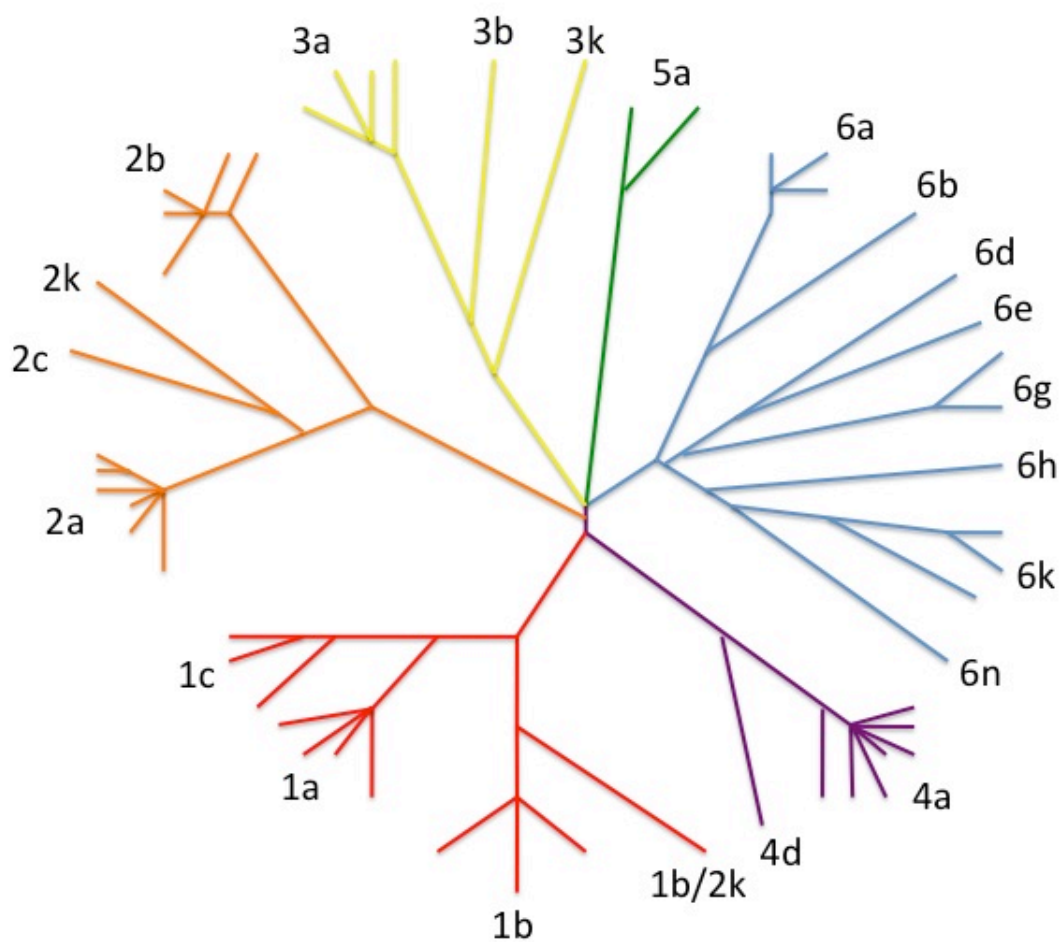
1.1. Génotype, sous-type et quasiespèce

Cette section a pour objectif de démontrer la diversité du VHC, causée en premier lieu par la présence de l'ARN polymérase ARN-dépendante qui est caractérisée par un taux élevé d'erreurs. Cette diversité explique en partie la capacité du virus d'échapper au système immunitaire, les difficultés rencontrées dans la compréhension des mécanismes de pathogénèses et la mise au point d'antiviraux. Pour le VHC, il y a 6 génotypes qui varient entre eux de 31 à 33 % au niveau de la séquence nucléotidique. Leurs prévalences diffèrent d'un pays à l'autre (figure 1). De nombreux sous-types ont été décrits pour chaque génotype, les principaux étant inclus dans la figure 2. La variation nucléotidique entre sous-types est de 20 à 25 % (Simmonds, P. et al, 2005). De plus, il y a une quasiespèce, et des centaines de variantes la composent. (Martell, J.I. et al, 1992).



Référence : <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-index>

Figure 1 : Représentation de la prévalence (%) des différents génotypes du VHC dans le monde et en Amérique du Nord



Référence : Timm J. et al. World Journal of Gastroenterology. 2007

Figure 2 : Arbre phylogénétique du VHC représentant les principaux génotypes, 1 à 6 et les principaux sous-types.

1.1. Morphogénèse et Cycle de réplication

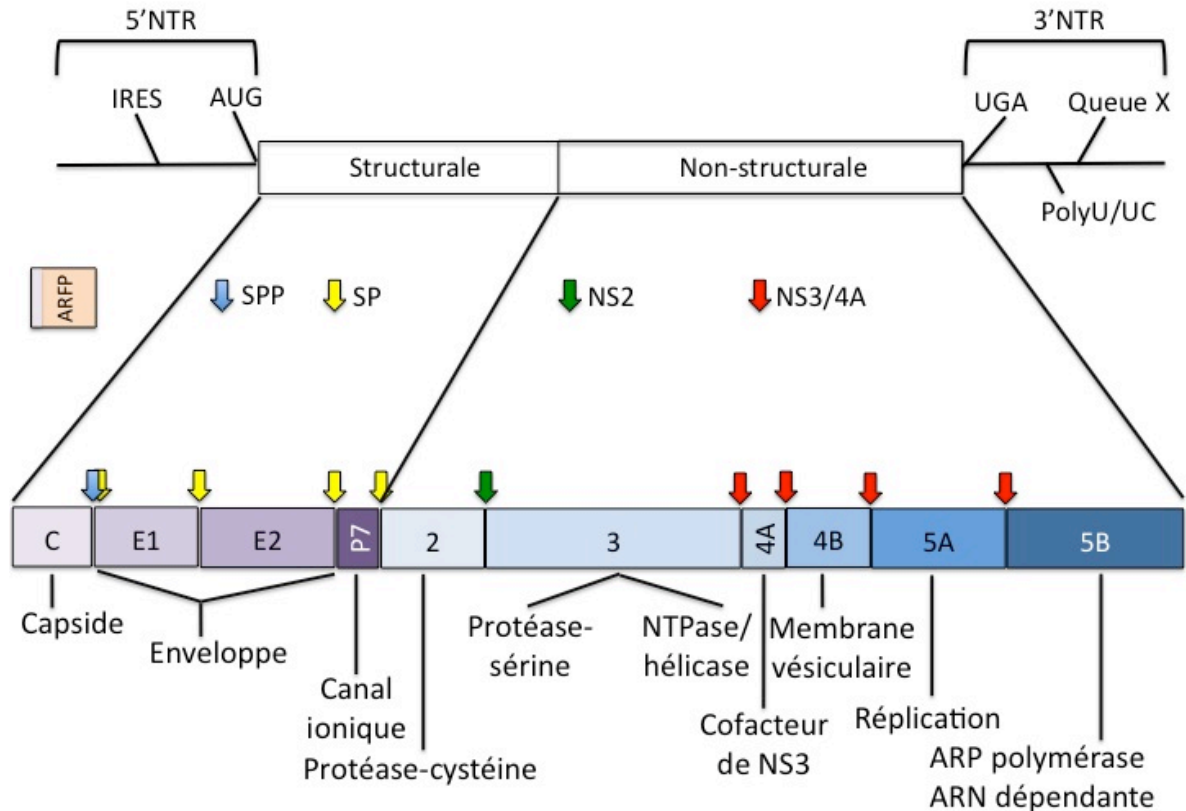
1.1.1. Morphogénèse

Cette section n'est pas une revue en profondeur, mais plutôt un résumé permettant de comprendre et de se familiariser avec l'organisation génomique du VHC, les caractéristiques des ses protéines virales et son cycle de réplication.

1.1.1.1. Organisation génomique

Le génome du VHC contient un cadre de lecture ouvert (ORF), d'environ 9700 nucléotides, qui permet la production d'une polyprotéine. L'ORF est bordé par 2 régions non codantes, le 5'NTR et le 3'NTR (Choo Q.L. et al, 1989) (figure 3).

Le site d'entrée interne du ribosome (IRES), contenant les 341 premiers nucléotides formant les domaines tige-boucles II à IV, est contenu dans le 5'NTR (Tsukiyama-Kohara, J.V. et al, 1992). Une fois que l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) est produite, après l'entrée virale et le clivage de polyprotéine, des ARNs de polarité négative sont produits (Behrens S.E. et al, 1996). Cette étape ne peut se faire sans la région 3'NTR, qui contient une séquence poly U/C suivie de 98 nucléotides formant les domaines tige-boucles contenus dans la queue-X (Yi, M. et al, 2003). Les ARN de polarité négative peuvent alors servir de matrice pour la production de nouveaux génomes de polarité positive. Le génome du VHC permet la production de la polyprotéine. Celle-ci se fait à partir du codon de départ (AUG), contenu dans le domaine SLIV, et est indépendante de la coiffe (Spahn, C.M. et al, 2001).



Référence : Bartenschlager R. et al. Curr Opin Microbiol. 2006

Figure 3 : Organisation du génome du VHC

L'ORF permettant la production de la polyprotéine est bordé de 2 séquences non codantes (NTR) : 5'NTR et 3'NTR. La partie 5'NTR contient le site d'entrée des ribosomes (IRES) et permet l'initiation de la traduction de la polyprotéine. La partie 3'NTR contient une séquence poly U/C et une queue X nécessaires à la réplication du génome. La polyprotéine est clivée successivement par des signal peptidases cellulaires (flèches bleues et jaunes), puis par la protéase et son cofacteur NS3/4A (flèches rouges) afin de produire les protéines 1) structurales : core, E1, E2, P7 et 2) non structurales : NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et

NS5B. , l'« Alternate Reading Frame Protein » (ARFP) serait produite par changement de cadre de lecture +1.

1.1.1.2. Protéines virales

Au total, 10 protéines sont produites à partir de la polyprotéine du VHC. Une 11^{ème} protéine, l'ARFP, serait exprimée indépendamment suite à un changement de cadre de lecture des ribosomes (Xu, Z. et al, 2001; Walewski, J.L. et al, 2001).

La polyprotéine est clivée en premier par des protéases peptidases signal cellulaires, produisant les protéines structurales core, E1, E2 et P7. Les protéines non structurales sont ensuite produites par les protéases virales. NS2-NS3, autocatalytique, libère NS3 en N-terminal. Celle-ci, en association avec son cofacteur, NS4A, clive le reste de la polyprotéine et permet la production de NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (figure 3). Dans les paragraphes qui suivent, les protéines virales et leurs fonctions seront décrites dans le même ordre dans lequel elles apparaissent sur la polyprotéine du VHC.

La protéine core, de 21 kDa, a pour principale fonction la formation de la nucléocapside qui contient le génome viral. Elle fut détectée dans le cytoplasme, le réticulum endoplasmique, les mitochondries et dans certains cas dans le noyau (Selby, J. et al, 1993 ; Suzuki, R. et al, 1995 ; Barba, G. et al, 1997 ; Okuda, M. et al, 2002 ; Schwer, S. et al, 2004). Les nombreuses études faites sur core suggèrent qu'elle aurait de nombreuses fonctions essentielles dans la réplication virale, la maturation et la pathogenèse. Les glycoprotéines E1 et E2 sont insérées dans l'enveloppe virale et sont nécessaires pour l'entrée virale (Penin et al, *hepatology*, 2004). Elles ont respectivement un poids moléculaire de 33-35 kDa et 70-72 kDa (selon la glycosylation). E2 contient aussi 3 régions hypervariables (HVR). La région HVR1, permettrait au virus d'échapper à la pression sélective exercée par la réponse immunitaire de l'hôte (Weiner, A.J. et al, 1991 ; Kato, N. et al, 1992 ; Shirai, M. et al, 1999 ; Mondelli M.U. et al., 2001). La protéine P7, de 63 a.a., insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique, sert de canal ionique et

contribue ainsi au contrôle de la perméabilité (Carrere-Kremer, J.V. et al, 2002 ; Pavlovic, D. et al, 2003 ; Griffin S.D. et al, 2003). Comme bien des viroporines, elle pourrait être impliquée dans l'assemblage et la relâche des virions (Tian, J.V., et al 1995 ; Ewart, J.V. et al, 1996 ; Bodelon, G. et al, 2002).

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 21-23 kDa, qu'on retrouve au réticulum endoplasmique. Elle forme avec NS3 une autoprotéase. NS2 n'est pas essentielle pour la réplication virale, mais est essentielle dans la terminaison du cycle de réplication viral (Lohmann, V. et al, 1999 ; Khromykh, E.G. et al, 1997 ; Pietschmann, T. et al, 2006). NS3/4A forme un complexe bifonctionnel, essentiel dans le clivage de la polyprotéine et la réplication de l'ARN. NS3, de 69 kDa, contient le domaine sérine protéase lui conférant son activité et se lie de façon non covalente à NS4A, son cofacteur de 54 a.a. NS3 a aussi une activité hélicase-NTPase lui permettant de dérouler les duplexes d'ARN dans la direction 3' à 5' ; et durant la réplication on pense que celle-ci se transloque sur son substrat d'acide nucléique grâce à des changements de sa conformation induits par l'énergie fournie par l'hydrolyse de NTP (Serebrov, A.M. et al, 2004 ; Levin, M.K. et al, 2005 ; Dumont, S. et al, 2006). On pense que NS4A aurait comme fonction principale d'ancrer NS3 à la membrane du RE (Wolk, B, JV, 2000). NS4B, de 27 kDa, se retrouve aussi à la membrane du RE où elle a la fonction d'induire la formation de compartiments à la membrane, une sorte de toile où la réplication de l'ARN se ferait (Egger, B. et al, 2002 ; Gao, L. et al, 2004). NS5A est aussi encrée à la membrane, et retrouvée sous une forme phosphorylée de 56 kDa ou hyperphosphorylée de 58 kDa. Jusqu'à présent, sa fonction reste inconnue, mais on sait qu'elle peut influencer l'efficacité de la réplication (Appel, N. et al, 2005). NS5B, 68 kDa, est l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC (RdRp). Elle se retrouve aussi au réticulum endoplasmique (Moradpour, V. et al, 2004 ; Schmidt-Mende, J. et al, 2001). Enfin, il y a aussi l'ARFP dont la fonction reste encore inconnue. L'état des connaissances sur celle-ci sera revu en détail à la section 1.2 étant donné que la caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire contre cet antigène est un des objectifs de ce mémoire.

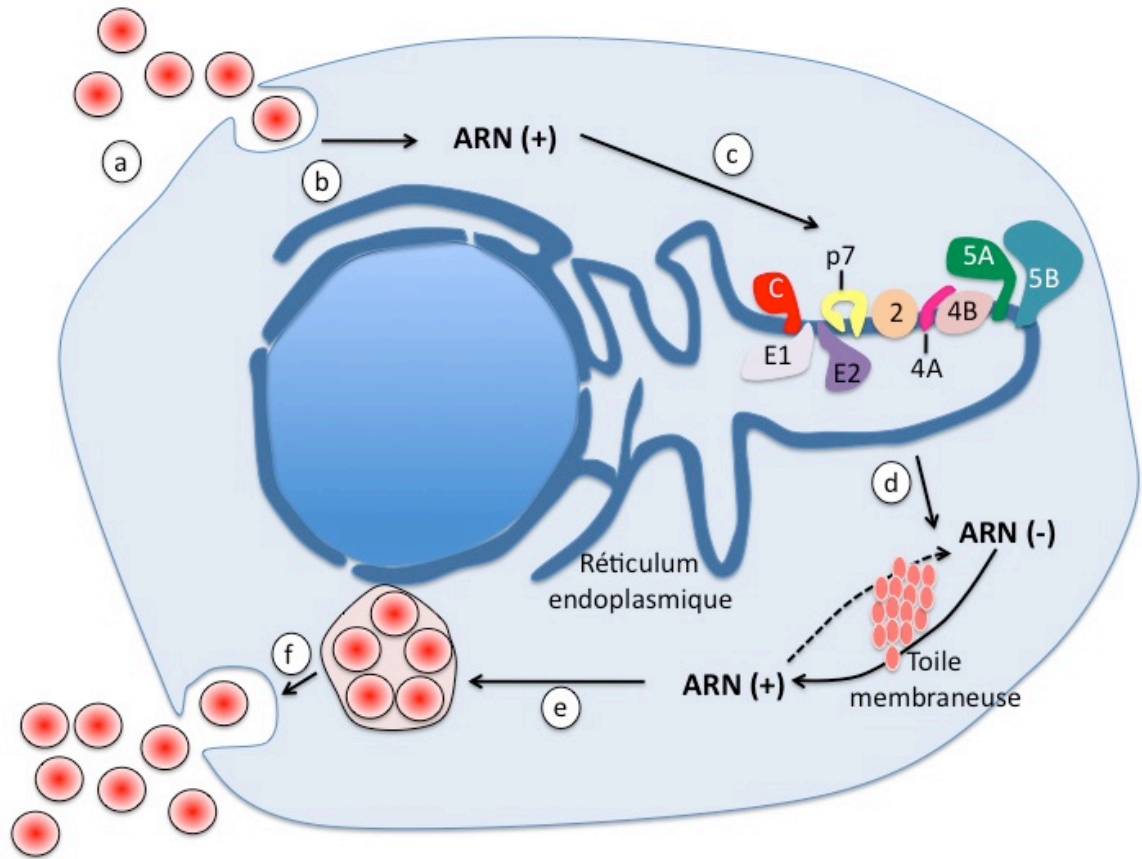
1.1.2. Cycle de réplication

Le faible niveau de réplication du VHC en culture cellulaire a entravé les études du cycle de réplication du VHC, mais voici ce qui est connu (figure 4). Les interactions entre les récepteurs des cellules hôtes et les protéines virales d'attachement dictent le tropisme du virus. Pour le VHC, les cellules principalement ciblées sont les hépatocytes. D'autres types de cellules pouvant être infectées, telles que les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes B ont aussi été rapportés. Pour l'attachement et l'entrée du virus, plusieurs récepteurs ont été proposés. CD81 a été le premier à être identifié comme récepteur putatif du VHC (Pileri, P. et al, 1998). Il s'agit d'une protéine, de la famille des tétraspanines, qui est impliquée dans de nombreuses activités telles que : l'adhésion cellulaire, la mobilité, les métastases, l'activation et la transduction cellulaire (Levy, S. et al, 1998). Il fut démontré que E2, *via* sa boucle extracellulaire, se lie avec haute affinité à CD81 (Pileri, P. et al, 1998). Il y a aussi le « scavenger receptor » -B1 (SR-B1), impliqué dans le transport bidirectionnel du cholestérol, qui pourrait servir de récepteur pour le VHC (Scarselli, E. et al, 2002). Il fut démontré par des expériences bloquant l'expression de SR-B1 que l'entrée des pseudoparticules du VHC (VHCpp) était grandement diminuée (Lavillette, D. et al, 2006). Il a été proposé que CD81 et SR-B1 seraient respectivement le récepteur et le corécepteur primaires du VHC, puisque leur présence à la surface des hépatocytes permet l'entrée virale, mais d'autres types de cellules exprimant aussi ces récepteurs ne sont pas permissifs au VHCpp (Bartosch, B. et al, 2003). Des études ont aussi été faites portant sur les récepteurs LDL, la claudine-1, l'occludine, des lectines de type C, L-SIGN, DC-SIGN et l'asiologlycoprotéine récepteur, qui ont de l'affinité pour les protéines E1 et E2 (Agnello, V. et al, 1999 ; Evans, M.J. et al, 2007 ; Bartosch, B. et al, 2006, Ploss, A. et al; 2009, Cocquerel, L, J. et al, 2006 ; Gardner, J.P., 2003 ; Lozach, Y. et al, 2003 ; Saulnier, B. et al, 2003). Cependant, d'autres études seront nécessaires afin de confirmer leur importance dans l'attachement et l'entrée du VHC.

L'internalisation du virus se ferait par le processus d'endocytose clathrine-dépendante (Blanchard, E. et al, 2006). L'acidification des endosomes induirait la fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome, ce qui permettrait de relâcher le génome viral encapsidé dans le cytoplasme de la cellule. Par contre, ces étapes restent à être démontrées, mais on suppose que c'est le cas, puisque pour des virus de la même famille que le VHC, c'est ce qui se produit (Modis Y. et al, 2004). Les mécanismes régulateurs de la traduction, de la réplication et de l'encapsidation du génome viral restent mal connus.

On sait qu'une des caractéristiques des virus à ARN de polarité positive est la formation d'un complexe de réplication membranaire (Salonen, A. et al, 2004 ; Mackenzie, J. et al, 2005). Pour le VHC, c'est NS4B qui formerait une toile dans des membranes dérivées du réticulum endoplasmique afin de former ce complexe de réplication (Egge, D. et al., 2002 ; Gosert, R. et al, 2003). D'autres études seront nécessaires afin de détailler le fonctionnement de cette structure lors de la réplication du VHC.

En conclusion, l'encapsidation, l'assemblage et la relâche des particules virales restent encore mal compris. On pense que les virions se forment par bourgeonnement dans le RE ou dans des membranes dérivées du RE, et que la sortie des nouveaux virions pourrait se faire *via* l'appareil sécrétoire de la cellule. Les protéines structurales du VHC ont été observées dans le RE et l'appareil de Golgi (Serafino, A, J. et al, 2003 ; Sato, K. et al, 1993).



Référence : Moradpour D. et al. Nature Reviews, Microbiology. 2007.

Figure 4 : Cycle de réplication du VHC

a) Attachement du virus et entrée, b) Relâche au niveau du cytoplasme, c) Traduction de la polyprotéine, d) Réplication de l'ARN, e) Assemblage des virions, f) Maturation et relâche.

1.2. « Alternative Reading Frame Protein »

1.2.1. Historique

C'est en 2001 que la protéine « Alternative Reading Frame Protein » (ARFP) a été découverte grâce à des analyses de bio-informatique (Walewski, J.L. et al, 2001). D'abord, des alignements de 8 séquences d'ARN complètes provenant de divers génotypes (1a, 1c, 2a, 2b, 3a, 3k, 4a, 6g) ont permis de trouver un groupe de codons synonymes conservés indiquant la présence d'un autre cadre de lecture retrouvé chez la plupart des génotypes du VHC (Walewski, J.L. et al, 2001). Puis, une autre étude a démontré qu'une nouvelle protéine, la protéine F, était produite par un mécanisme de changement de cadre de lecture +1 du ribosome (Xu, Z, et al, 2001). Par des expériences *in vitro* comportant l'incubation de transcrits d'ARN du VHC-1 (échantillon original de Chiron, 1987) dans des extraits cellulaires, ils ont démontré qu'une protéine de 17 kDa, comptant pour 30% du total des protéines, était produite en même temps que core (21 kDa).

De plus, des résultats positifs d'analyses par immunoblot et/ou ELISA du sérum de patients infectés par le VHC ont permis de démontrer que l'ARFP est exprimée *in vivo* (Walewski, J.L. et al, 2001 ; Xu, Z. et al, 2001). Par la suite, d'autres études ont confirmé la présence d'anticorps anti-ARFP chez des patients infectés par le VHC (Vassilaki, N et al, 2003 ; Boulant, S et al, 2003, Komurian-Pradel, F. et al, 2004, Bain, C. et al, 2004 ; Cohen, M. et al, 2007) ainsi que la présence de lymphocytes T spécifiques contre l'ARFP (Bain, C. et al, 2004 ; Troesch, M. et al, 2005).

De nombreux autres mécanismes hypothétiques d'expression de l'ARFP ont ensuite été proposés et seront abordés dans la partie 1.3.2 (Expression et fonction). Ils ont donné naissance à la famille des ARFPs dont la nomenclature suivante a été proposée (Branch, A. et al, 2005) : ARFP/F pour la protéine ARFP initialement proposée (Xu, Z et al, 2001), exprimée à partir du changement de cadre de lecture +1 dans la région du codon

11, ARFP/DF pour la protéine ARFP produite par double changement de cadre de lecture (Boulant, S. et al, 2003), et l'ARFP/S pour la forme la plus petite de l'ARFP initiée à l'un des codons de départs (AUG) situés près du codon 80 (Figure 5).

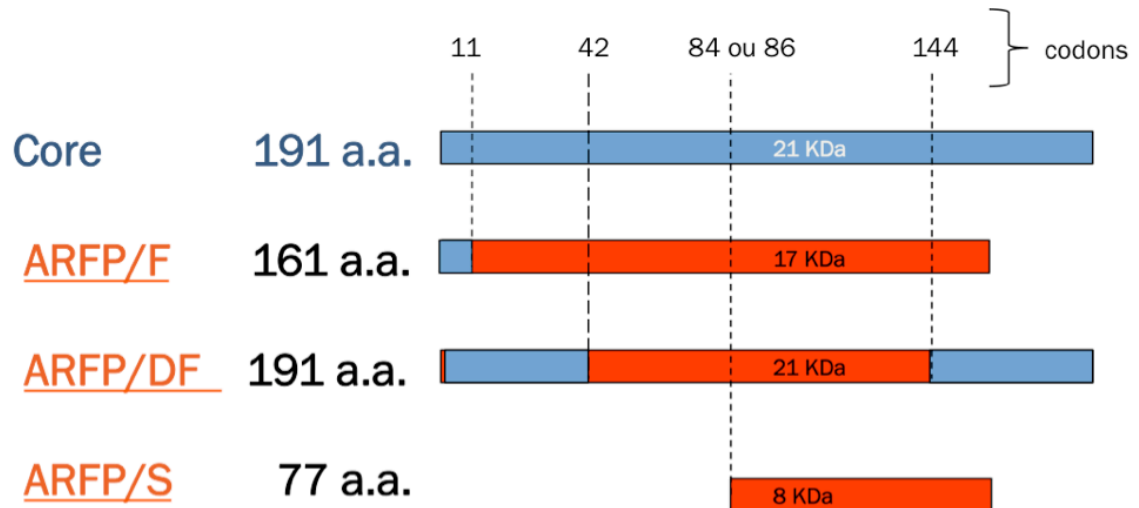


Figure 5 : Familles des protéines ARFPs

L'ARFP/F exprimé à partir d'un changement de cadre de lecture au codon 11, l'ARFP/DF exprimé par un changement de cadre de lecture au codon 42 puis retour à la séquence de core par au codon 144, l'ARFP/s exprimé à partir des codons 84 ou 86.

1.2.2. Expression et fonction

De tous les mécanismes d'expression possible de l'ARFP, c'est celui du changement de cadre de lecture programmé du ribosome qui est le mieux supporté par des évidences expérimentales (Xu, Z. et al, 2001; Varaklioti, A. et al, 2002 ; Choi, J. et al, 2003, Baril, M. et al; 2005). Il s'agit d'une classe particulière de signaux de recodages (Gesteland, R.F. et al, 1998) qui pendant la traduction de l'ARN, induisent le ribosome à

utiliser un autre cadre de lecture. Durant la synthèse, on croit que le ribosome commence la synthèse au codon AUG du cadre de lecture principal. Entre les codons 9 à 11, une région riche en alanine, constituant le signal (AAA), stimulerait le ribosome à glisser dans le cadre de lecture +1. La traduction se terminerait lorsque le ribosome rencontrerait le 1^{er} codon STOP du cadre+1, ce qui produirait une protéine de 17 kDa (L'ARFP/F) (Xu, Z. et al, 2001 ; Varaklioti, A. et al, 2002). Enfin, une autre étude a démontré que la synthèse de l'ARFP ne nécessitait pas de changement de cadre de lecture, mais plutôt que l'initiation de la synthèse pouvait se faire au codon 26 de la polyprotéine. Ils ont en outre démontré qu'au codon 26(+1), GUG dans 18% des cas, que le ribosome peut initier la traduction de l'ARFP (Baril, M. et al; 2005).

Un deuxième mécanisme d'expression de l'ARFP est celui du double changement de cadre de lecture qui permettrait la production de l'ARFP/DF (Boulant, S. et al, 2003). Il s'agirait d'une protéine chimère composée en C-terminal de 42 acides aminés de la séquence de core, au milieu de 101 acides aminés correspondant à l'ARFP, puis en N-terminal de 30 acides aminés de core. Dans ce cas, contrairement au changement de cadre de lecture programmé, la région riche en alanine ne serait pas impliquée. Le changement de cadre de lecture se produirait grâce à la présence d'éléments structuraux hautement conservés, des tiges-boucles, présentes dans l'ARN du VHC. Le 1^{er} changement de cadre de lecture (+1) se produirait lors du passage du ribosome dans la tige-boucle VI au niveau du codon 42. Le retour dans le cadre de lecture de core se ferait au niveau de la tige-boucle terminale au niveau du codon 144. La protéine produite serait alors de 21 kDa et pourrait facilement être confondue avec core qui a le même poids moléculaire. Il a été démontré que ces signaux de tiges-boucles étaient actifs dans les cellules eucaryotes et procaryotes, ce qui a permis de confirmer la possibilité qu'ils puissent être impliqués dans la production de l'ARFP/DF (Boulant, 2003).

Un troisième mécanisme a aussi été proposé qui permettrait l'expression de l'ARFP/S (Vassilaki, N. et al, 2003). Il a été démontré lors d'expérience de transfection

qu'une forme plus petite de l'ARFP peut être exprimée près du codon 80. Cette région contient 2 codons de départ (AUG), et lorsque ceux-ci ont été supprimés, la production de l'ARFP/S fut bloquée (Vassilaki, N. et al, 2003). Cette forme serait la plus petite des 3 et aurait une taille de 8 kDa.

Plusieurs groupes ayant effectué des études sur l'ARFP lui ont attribué différentes fonctions qui restent encore hypothétiques. Récemment, un groupe a exclu l'importance de l'ARFP/F et l'ARFP/DF dans la réplication virale et l'infectivité du VHC en faisant des études *in vivo* chez un chimpanzé ainsi qu'*in vitro* à l'aide du système de réplication virale Huh-7.5 (McMullan, L.K. et al, 2007) et de virus mutants n'exprimant pas l'ARFP. Par contre, cette même étude a démontré que la structure secondaire SLVI de l'ARN viral, contenu dans la région des protéines core et l'ARFPs, était un élément important pour la réplication virale. Cette étude n'a cependant pas pu exclure l'importance de l'ARFP/S. D'autres études ont accumulé des résultats suggérant que l'ARFP pourrait conférer un avantage sélectif pour le VHC dans les cas où le foie est très endommagé, par exemple dans les cas de cancers hépatiques (Alam, S.S., et al, 2002 ; Ogata, S. et al, 2002 ; Yeh, C.T. et al, 2000 ; Basu, A. et al, 2004 ; Fiorucci, M. et al, 2007 ; Ma, H.C. et al, 2008). Une autre étude a indiqué que la thérapie à l'interféron- α pourrait induire l'expression de l'ARFP, ce qui suggère que l'ARFP pourrait agir comme un facteur de virulence et aider le VHC à résister dans l'adversité (Bain, C. et al, 2004).

Enfin, 3 mécanismes tentant d'expliquer l'expression de l'ARFPs ont été proposés et il demeure incertain lequel est /lesquels sont utilisé(s) *in vivo* pour la production de cette protéine et sous quelle forme celle-ci est produite : l'ARFP/F, l'ARFP/DF, l'ARFP/S. De plus, différentes études mentionnées ci-dessus suggèrent différents rôles pour l'ARFP : facteur de virulence et facteur oncogénique. L'étude de McMullan L.K. et al. (2007), bien qu'ayant montré la nécessité de la tige-boucle VI pour l'infectivité du VHC, n'a pas permis de clairement discriminer entre la nécessité de la tige-boucle VI et la nécessité de l'ARFP pour VHC. De plus, dans cette étude, en absence de l'expression de l'ARFP, l'infection au

VHC n'a pas persisté chez le chimpanzé, ce qui n'a pas permis d'exclure que l'ARFP joue un rôle dans l'établissement de persistance virale. Des études du rôle de l'ARFP dans le cycle de réplication viral pourraient s'avérer intéressantes afin de mieux comprendre le rôle de l'ARFP. Surtout que l'ARFP est située dans la position idéale pour agir comme régulateur. Une étude a démontré, en utilisant un système de gènes rapporteurs (en culture cellulaire), que l'ARFP est synthétisé dans une proportion de 2% relativement à la polyprotéine. Une telle concentration n'est pas rare pour les protéines virales régulatrices contrôlées au niveau traductionnel (Baril, M. et al, 2005). De plus, l'ARFP chevauche le cadre de lecture principal à son début où elle a, lorsqu'elle est produite, le potentiel d'interrompre la production de la polyprotéine pour une ronde complète. L'ARFP est aussi exprimée dans un autre cadre de lecture, donc indépendamment de la polyprotéine du VHC. Tous ces arguments suggèrent qu'elle pourrait agir comme un régulateur.

1.2.3. État des connaissances sur la réponse immunitaire contre L'ARFP

1.2.3.1. Réponse immunitaire humorale contre l'ARFP

Le but des premières études qui ont démontré la présence d'anticorps anti-ARFP était de confirmer l'existence de l'ARFP (Walewski, J.L. et al, 2001 ; Xu, Z. et al 2001, Varaklioti, A. et al, 2002). La seule étude à grande échelle ayant pour but de déterminer la prévalence de la réponse humorale a été faite par le groupe de Komurian-Pradel (2004). Cette étude a été faite sur un groupe de 340 patients : 154 ayant une infection persistante au VHC (génotypes 1, 2, 3, 4, 5), 65 autres souffrant d'autres maladies du foie (hépatite B, hépatite auto-immune, hépatite alcoolique) et 120 contrôles sains. Sur les 154 patients infectés au VHC, 60% ont démontré la présence d'anticorps anti-ARFP lorsqu'un test ELISA utilisant une protéine recombinante l'ARFP complète fut effectué. Lorsqu'une forme de l'ARFP tronquée des 10 premiers acides aminés de core (ARFP $\Delta(1-10)$) fut utilisée comme source d'antigène, le pourcentage fut de 25%. Chez ce même groupe de

patients infectés au VHC, 97% avaient des anticorps contre la protéine core. De plus, aucune réponse humorale contre l'ARFP et core ne put être détectée chez les 2 autres groupes (autres maladies de foie et personnes saines). Enfin, aucune corrélation entre la prévalence d'anticorps et le génotype ou la charge virale ou le degré de progression de maladie du foie n'a pu être établie. Il fut aussi démontré par une autre étude que 41.6% de patients infectés au VHC (N=47) présentaient des anticorps contre l'ARFP lorsqu'un peptide de 99 acides aminés de l'ARFP (a.a. no 42 à 141, génotype 1b, isolat JA) était utilisé (Bain, C. et al, 2004). Une autre étude, celle de Troesch M. et al (2005) faite sur des patients majoritairement co-infectés avec le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), démontra que 60% des patients présentaient des anticorps contre une forme tronquée de l'ARFP (ARFP mut8Δ10). La plus récente des études n'a pu observer de corrélation entre le traitement à l'interféron- α et la prévalence d'anticorps contre l'ARFP chez des patients (n=44) infectés au VHC avant, pendant et après le traitement (Cohen, 2007). La prévalence des anticorps contre l'ARFP fut estimée à 99% lorsqu'une forme complète de l'ARFP étant utilisée (contenant les 10 1^{er} a.a. communs avec core). Donc le rôle et l'importance des anticorps dirigés contre l'ARFP restent encore à déterminer. Enfin, la prévalence d'anticorps spécifiques contre l'ARFP (forme tronquée des a.a. de core) varie de 25% (Komurian-Pradel, F. et al, 2004) à 60% (Bain, C. et al, 2004 ; Troesch, M. et al, 2005) selon les études.

1.2.3.2. Réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP

La première démonstration de réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP a été faite par Bain C. et al en 2004. Dans cette étude, un groupe de patients ayant une infection persistante au VHC ou ayant résolu spontanément (N=44) furent testés par ELISpot anti-IFN- γ ou anti-IL-10 en utilisant comme antigène un peptide de 99 acides aminés de l'ARFP (a.a. n° 42 à 141, génotype 1b, isolat JA). Il fut démontré que 20% des patients infectés au VHC (génotype 1a, 1b et 3) avaient des lymphocytes T spécifiques réagissant au peptide de 99 a.a. (génotype 1b). En étudiant longitudinalement la réponse humorale et cellulaire

contre l'ARFP chez des patients infectés au VHC et sous thérapie à l'interféron- α , cette étude ne put établir de corrélation entre la présence de la réponse contre l'ARFP et la charge virale ou le résultat de la thérapie. Il en fut de même pour la corrélation avec la cinétique de la réponse spécifique contre l'ARFP (Bain, C. et al, 2004). Plus récemment, une autre étude faite chez un groupe de 11 patients infectés au VHC dont 9 co-infectés au VIH, à l'aide d'une protéine recombinante de l'ARFP mut8 Δ 11 (génotype 1a, isolat TVC33), démontra que 82% des patients contenaient des précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques effecteurs (CTLs) contre l'ARFP (Troesch, M. et al 2005). Cette même étude permit d'identifier 3 nouveaux épitopes putatifs de CTLs restreints HLA-A*0201 spécifiques contre l'ARFP. En accord avec la conservation de la séquence de l'ARFP entre génotypes, ces 2 études ont démontré qu'il y avait réaction croisée entre l'ARFP dérivée d'un génotype spécifique (1b ou 1a) avec les autres génotypes (1a, 1b, 2a, 3).

1.3. La réponse immunitaire contre le VHC

1.3.1. La réponse innée

1.3.1.1. Les récepteurs toll-like (TLR) et le VHC

Les TLRs reconnaissent les patrons moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et sont impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire innée. Lors d'infection par des pathogènes, les TLRs induisent des signaux pro-inflammatoires tels que le facteur nucléaire κ B, la kinase c-jun-N-terminale (JNK), p38 et la voie de l'interféron, et régulent ainsi les réponses antivirales et antibactériennes. La reconnaissance des PAMPs par les TLRs est une des pierres angulaires de la réponse innée et fournit une réponse rapide et efficace contre les pathogènes (Aller, H.J., 2000). De plus, des évidences appuient la contribution des TLRs dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative, telle que la maturation des cellules dendritiques et la réponse des lymphocytes B (Li, K et al, 2005).

Le VHC interagit avec les TLRs à différents niveaux. Par exemple, les TLR3 et TLR7, qui signalent respectivement par IRF7 et IRF3, à la surface des cellules ou à l'intérieur de vésicules cytosoliques peuvent détecter la présence d'ARN viral simple ou double brin respectivement (Li, K. et al, 2005 ; Horsmans, T. et al , 2005; Iwasaki, A. et al, 2004). Le résultat est la production de l'IFN- α et l'IFN- β . La liaison de faible affinité de la protéase NS3/4a à son substrat lui permet de se lier à différents substrats et donc de cliver différentes protéines cellulaires (Ferreon, J. et al, 2005). NS3/4a fonctionne comme un antagoniste de l'activation, provoquée par le virus, de IRF3 et de l'expression de l'IFN- β par sa capacité à bloquer la signalisation *via* RIG-I et d'empêcher la signalisation par TLR3 en clivant la protéine adaptatrice TRIF (Ferreon J et al, JBC, 2005 ; Li K, PNAS, 2005 ; Foy E, PNAS, 2005).

La liaison de l'ARN au PAMP durant la réplication du VHC aboutit à la conformation ouverte de RIG-I, ce qui permet d'induire une cascade de signalisation qui résulte en l'activation de IRF-3 (Foy, E. et al, 2005). NS3/4a clive et inactive une ou plusieurs composantes de la voie de signalisation de RIG-I qui sont essentielles pour l'activation de IRF-3 et NF- κ B retrouvés en aval (Ferreon, J. et al, 2005).

D'autres études récentes rapportent que le VHC peut échapper à l'immunité innée en interférant avec la voie TRIF-TBK1-IRF3 à plusieurs niveaux. D'abord, NS3/4a induit la dégradation de l'adaptateur TRIF (Li, K. et al, 2005). NS3/4a entrave à la fois l'activation de TRIF et NF- κ B en réduisant l'abondance de TRIF. De plus, elle interagit avec TBK1, ce qui résulte en la diminution de l'interaction avec TBK1-IRF3 et l'inactivation de IRF3 (Otsuka, M. et al, 2005).

La capacité de NS3/4a à bloquer RIG-I et d'empêcher la signalisation par le TLR3 a plusieurs implications. D'abord, il y a atténuation de 2 voies de signalisation majeures pour la production de l'IFN- γ par les hépatocytes. Deuxièmement, l'amplification de la signalisation de la voie des PAMPs qui se fait normalement par l'IFN- γ est arrêtée.

Troisièmement, les composantes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont elles-mêmes stimulées par les gènes stimulés par l'IFN- γ (ISG) (Der S.D. et al, 1998), donc une diminution de la production d'IFN- γ a pour effet d'altérer la présentation des antigènes contribuant à une activation inefficace des lymphocytes T cytotoxiques et aidant au développement de l'infection persistante (Su, A.E. et al, 2002). Quatrièmement, IRF-3 sont aussi apoptotiques et des suppresseurs de tumeurs. Un blocage prolongé de la fonction de IRF-3 pourrait avoir comme conséquence de rendre les cellules infectées plus aptes à se multiplier en absence de bons contrôles, ce qui pourrait indiquer un lien entre le développement de cancers hépatiques et l'infection chronique au VHC (Liang, T.J. et al, 2004). Enfin, l'activité de NF- κ B régule l'expression de nombreux gènes de chimiokines et cytokines. Le blocage de NF- κ B, pourrait donc contribuer à l'inefficacité du système immunitaire à contrôler l'infection au VHC (Foy E, et al, 2005).

D'un autre côté, les protéines core et NS3 activent les TLR2 des monocytes et macrophages à induire la production de TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-8 *via* les voies de signalisation de NF- κ B, JNK/AP-1, p38 et ERK (Dolganiuc, A. et al, 2004). Ceci entraîne l'induction des voies inflammatoires et contribue à l'activation de la réponse immunitaire innée.

Chez les patients infectés au VHC, le niveau d'expression du TLR4 est augmenté chez les cellules B par 3 à 6 fois (Machida, K. et al, 2006). Cette induction est médiée par la protéine NS5A et conduit à une plus grande sécrétion d'IFN- β et d'IL-6 (Machida, K. et al, 2006). Il est possible que l'augmentation de l'expression du TLR4 et NF- κ B et l'activation de JNK et p38 contribuent à l'environnement pro-inflammatoire lorsque l'infection chronique au VHC est au stade avancé qui est associé avec la fibrose du foie et le développement de cancers hépatiques.

Enfin, le VHC est reconnu par les TLRs 2, 3 et 7 respectivement *via* NS3, l'ARN double-brin viral, et l'ARN simple-brin. Ceci résulte en la production d'IFN- α et IFN- β , l'induction de la voie inflammatoire et contribue à l'activation du système immunitaire

inné. Cependant, le VHC a évolué afin échapper à ces mécanismes du système immunitaire inné. Ceci a pour effet de diminuer les interactions entre TBK1 et IRF3 et inhibe l'activation de IRF3. D'un autre côté, NS5A et NS3 sont impliqués dans la stimulation de réponse inflammatoire qui est associée avec la fibrose du foie et le développement de cancers hépatiques.

1.3.1.2.Effet du VHC sur les cellules dendritiques et NK

L'accumulation d'évidences suggère que les cellules tueuses naturelles (NK) pourraient jouer un rôle important dans l'infection au VHC, et un modèle existe où les cellules NK ont été placées au centre des mécanismes d'évasion du VHC (Golson-Masson, L. et al, 2006). Les cellules NK sont les cellules effectrices antivirales de la réponse immunitaire innée (Trinchieri, G. et al, 1989). La stimulation des cellules T naïves par les cellules dendritiques (DCs) exprimant des peptides viraux complexés au CMH est essentielle pour l'induction de la réponse adaptative. Des avancées récentes qui ont permis de mieux comprendre la biologie des cellules NK ont permis de démontrer un phénomène de « discussion-croisée » les DCs (Chiesa, M.D. et al, 2005).

Les cellules NK, contrairement aux lymphocytes B et T, n'expriment pas de récepteurs antigène-spécifiques et ne développent pas de mémoire immunitaire. Le contrôle de leurs fonctions est en fonction de la balance entre des signaux stimulants et inhibiteurs. Cependant, les cellules NKs ne sont pas indépendantes du CMH (Hamerman, J.A. et al, 2005), et l'hypothèse du « soi manquant » explique comment la diminution de l'expression du CMH I de cellules infectées ou transformées les rendent sensibles à la lyse induite par les NKs (Ljunggren, H.G. et al, 1985 ; Ljunggren H.G. et al, 1990). Autre que l'activité cytolytique, les cellules NKs produisent aussi des cytokines : IL-3, GM-CSF, TNF- α , TGF- β , IFN- γ . On croit que ces 2 fonctions sont importantes dans le contrôle des infections virales (Guidotti, L.G. et al, 1999).

Comme déjà mentionné, les NKs ne sont pas seulement importantes pour la réponse innée, mais aussi pour la réponse adaptative. La « discussion-croisée » avec les DCs se produit de plusieurs façons. D'abord, les interférons de type I sécrétés par les DCs pourraient aider l'activité cytotoxique des cellules NK en induisant l'apoptose pour les ligands induits au TNF- α (Hayakawa, Y. et al, 2004 ; Mirandola, P. et al, Blood, 2004) et on sait que ceci se produit dans le foie, le site d'infection du VHC (Mundt, B. et al, 2003). Deuxièmement, les cellules dendritiques matures sont une source d'IL-12 et d'IL-15, ce qui augmente l'activité cytotoxique et la production d'IFN- γ par les cellules NK et promeut respectivement leur survie et leur différenciation *in vivo* (Trinchieri, G. et al, 2003; Fehniger T.A. et al, 2001). Troisièmement, en promouvant la prolifération des cellules T antigènes-spécifiques, qui sécrètent de l'IL-2, les DCs pourraient activer les NKs indirectement (Hayakawa, Y. et al, 2004). Quatrièmement, les cellules NK sont nécessaires dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et T auxiliaires parce que la maturation de DCs est dépendante de la discussion-croisée NK : DC. Cinquièmement, les DCs matures peuvent aussi activer les cellules NKs (Gerosa, F. et al, 2002). Finalement, les NKs activées par l'IL-2 tuent les cellules dendritiques immatures et pourraient jouer un rôle dans la diminution de la réponse immunitaire étant donné que l'IL-2 est de prime abord produite par les cellules inflammatoires activées (Terrazzano, G. et al, 2004 ; Carbone, E. et al, 1999). Conséquemment, les cellules NK pourraient avoir un rôle important non seulement durant la phase aiguë de l'infection, mais aussi dans l'établissement de la persistance virale. De plus, on sait que plusieurs mécanismes viraux ont évolué afin d'inhiber les cellules NKs (Lodoen, M.B., 2005).

Pour la clairance du VHC, on sait qu'une réponse soutenue et multispécifique des cellules T CD4+ et CD8+ est critique (Shoukry, N.H. et al, 2004). Une réponse inadéquate des cellules T pourrait provenir de différentes causes et sera abordée plus en détail dans la partie sur l'immunité adaptative. Cependant, il est possible qu'une des causes puisse être l'inhibition de la fonction des cellules NK. La population lymphocytaire du foie est

composée par plus de 50% de NKs (Doherty, D.G. et al, 2000). L'inhibition des cellules NK pourrait jouer un rôle important pour les virus infectant les hépatocytes et le VHC est connu pour affecter les cellules NK (Corado, J. et al, 1997). D'ailleurs, plusieurs études suggèrent que la persistance du VHC pourrait être associée avec la réponse des NKs *in vivo* autant dans la périphérie que dans le foie (Lodoen, M.B. et al, 2005 ; Bonavita, M.S. et al, 1993 ; Deignan, T. et al, 2002). De plus, le succès de la thérapie à l'IFN- α a été attribué à la restauration de la fonction des NKs chez des patients ayant une infection persistante au VHC (Shoukry, N.H., 2004 ; Gabrielli, A. et al, 1995). Les mécanismes d'inhibition des cellules NK par les VHC incluent la liaison de E2 à CD81 (Crotta, S. et al, 2002 ; Tseng, C.T. et al, 2002), core qui stabilise l'expression du CMH I (Herzer, K. et al, 2003) et du HLA-E (Nattermann, A.M. et al, 2005), une diminution de l'expression de MICA/MICB par les cellules DC (Jinushi, M. et al, 2003), et l'inhibition de la signalisation de l'interféron résultant en une activité plus faible de NKs. Finalement, par la perturbation de la « discussion-croisée » NK : DC, tous ces mécanismes pourraient contribuer à la production d'une réponse adaptative sous-optimale, observée lors de l'infection persistante au VHC.

1.3.2. La réponse adaptative

1.3.2.1. La réponse humorale

Lors de l'infection au VHC, la détection de l'ARN viral peu se faire aussi tôt qu'une semaine après l'infection. La détection des anticorps se fait habituellement plusieurs semaines plus tard. C'est à l'intérieur de 4 semaines que la séroconversion est constatée dans la majorité des cas, pour les protéines structurales et non structurales du VHC. Cependant, le rôle des anticorps demeure controversé, car leur présence ne peut prévenir la ré-infection; et certains individus qui ont résolu l'infection ne développent pas toujours d'anticorps (Farci, P. et al, 1992 ; Lai, M.E. et al, 1994 ; Post, J.J. et al, 2004). De plus, il n'y a pas de modèle de prédiction de l'évolution de l'infection relié à la présence

d'anticorps spécifiques contre le VHC. Chez des individus ayant guéri l'infection, il est aussi connu que les anticorps ne furent pas détectables 18 à 20 ans après la guérison, alors que la réponse cellulaire était détectable (Takaki, A. et al, 2000). La neutralisation croisée entre géotypes n'est pas non plus universelle (Meunier, J.C. et al, 2005). Jusqu'à récemment, il n'y avait pas de système permettant de tester l'efficacité des anticorps à neutraliser le VHC. Malgré tout, Farci P. et al (1996), ont réussi à décrire le premier épitope B neutralisant contre la région hypervariable 1 (HVR1) localisée dans E2. Sans doute que dans les années à venir d'autres épitopes neutralisants pourront être décrits. L'importance des anticorps dans la guérison contre l'infection au VHC ne peut pas être exclue, des sujets atteints d'hypogammaglobulinémie, maladie caractérisée par l'absence d'anticorps, ayant démontré une progression rapide de la maladie et une faible réponse aux traitements à l'IFN- α (Bjoro, K. et al, 1994). De plus, une autre étude a rapporté que 43% des patients ayant résolu l'infection spontanément avaient des anticorps spécifiques contre la région HVR de E2, contre seulement 13% pour les patients ayant une infection persistante (Dittmann, S. et al, 1991). Pour le moment, l'importance des anticorps dans l'infection au VHC reste encore à être établie. La mise au point récente d'un nouveau système de culture cellulaire *in vitro* du virus pourra certainement aider à étudier l'efficacité de la neutralisation des anticorps anti-VHC pendant l'évolution de l'infection.

1.3.2.2.La réponse cellulaire

Le contrôle du VHC, lors de la phase aiguë, est associé avec une réponse immunitaire cellulaire vigoureuse, dirigée contre de nombreux épitopes et dont l'activation est persistante (Racanelli, V. et al, 2003 ; Shoukry, N.H. et al, 2004 ; Bowen, D.G. et al, 2005 ; Rehmann, B. et al, 2005). La réponse cellulaire est habituellement détectable entre 4 et 8 semaines après infection (Woollard, D.J. et al, 2003 ; Cox, A.L. et al, 2005).

La résolution spontanée de l'infection est associée avec une réponse des cellules T qui est forte, maintenue, qui cible plusieurs épitopes et avec une production d'IFN- γ (

Lechner, F. et al, 2000 ; Thimme, R. et al, 2001). De plus, une réponse précoce des lymphocytes T CD4+ est prédictive du contrôle de l'infection et son maintien est associé avec la résolution de l'infection (Gerlach, J.T. et al, 1999 ; Missale, G. et al, 1996 ; Diepolder, H.M. et al, 1995 ; Eckels, D.D. et al, 2000 et Shoukry, N.H. et al, 2000). De plus, la perte de cette réponse est prédictive de la persistance du VHC (Day, C.L. et al, 2002; Shoukry, N.H. et al, 2004). De manière générale, lorsque l'infection persiste, on observe une diminution du nombre d'épitopes reconnus, du compte et de la fonction des lymphocytes T (Cox, A.J. et al, 2004). Il a été démontré que les lymphocytes produisaient moins d'IFN- γ , proliféraient peu et avaient une capacité limitée à tuer les cellules présentant l'antigène ciblé (Wedemeyer, H. et al, 2002 ; Lauer, G.M. et al, 2004). Dans certains cas, la réponse cellulaire est totalement perdue durant la phase aiguë, débouchant ainsi sur la persistance (Gerlach, J.T. et al, 1999).

1.3.3. Persistance ou guérison

L'aide provenant des lymphocytes T CD4+ est critique pour le maintien de la réponse des lymphocytes T CD8+ lors de l'infection au VHC. En effet, les cellules dendritiques doivent être activées par les lymphocytes T CD4+. Sans cette aide, elles ne peuvent présenter efficacement les antigènes aux cellules T CD8+ ce qui pourrait expliquer leur phénotype épuisé (Wherry, E.J. et al, 2004, Castellino, F. et al, 2006). De plus, l'apparition de virus mutants est fortement corrélée avec la progression vers l'infection persistante (Erickson, A.L. et al, 2001). Des mutations spécifiques ont été associées avec certains allèles de la molécule HLA-B du CMH I. Pour NS3, des mutations de certains épitopes ont été associées avec la persistance chez les individus HLA-B8 (Timm, J. et al, 2004). D'ailleurs l'étude de Geudieri, S. et al (2006) a permis de démontrer que le polymorphisme de certaines régions de NS3 est en partie causé par la pression immunitaire provenant de certains allèles des molécules HLA-A et HLA-B. Pour NS5B, des mutations dans des épitopes immunodominants ont été associées avec la persistance chez les individus

HLA-B27 (Neumann-Haefelin, C. et al, 2006). D'autres mutations sont aussi connues pour des épitopes restreints par des allèles de HLA-A (Ray, S.C. et al, 2005).

Il y aurait aussi l'historique immunologique de l'hôte qui pourrait influencer le développement de la persistance de l'infection au VHC. En effet, les premières cellules à répondre contre le virus pourraient être des cellules T mémoires, initialement stimulées par un autre pathogène, réagissant de manière croisée (Welsh, R.M. et al, 2002). Plusieurs conséquences peuvent découler d'un tel phénomène. Les cellules T mémoires pourraient bloquer la différenciation de cellules T naïves par compétition pour les cellules présentatrices d'antigène, les cytokines et le microenvironnement fourni par les ganglions lymphatiques (Cornberg, M. et al, 2006). La production rapide de cytokines par les cellules mémoires pourrait aussi bloquer la maturation de cellules dendritiques compromettant ainsi la stimulation des cellules T naïves (McMichael, A.J. et al, 1998). Les cellules T mémoires initialement stimulées ailleurs que dans le foie pourraient présenter des problèmes de « homing » vers cet organe. Enfin, il se pourrait aussi que la réponse immunitaire soit déviée par ces mêmes cellules mémoires. Pour le VHC, on sait que des cellules mémoires T spécifiques contre un épitope de l'influenza présent aussi sur la protéine NS3 ont pu provoquer de sévères dommages au foie et que l'infection persistante se développa (Wedemeyer, H. et al, 2005).

L'environnement particulier du foie pourrait aussi jouer un rôle dans la persistance. Cet organe contient de 5-10% de lymphocytes, dont environ 65% de lymphocytes T et 35% de cellules NK (Racanelli, V. et al, 2006). L'anatomie du foie présente de nombreux sinus qui ont pour effet de ralentir la circulation sanguine et de favoriser la présentation antigénique par les «liver sinusoidal endothelial cells » (LSEC) qui tapissent les sinus. La présentation des antigènes dans ce microenvironnement résulte souvent en la tolérance ou une activation inefficace des lymphocytes T (Limmer, A. et al, 2000). Les hépatocytes, retrouvés immédiatement sous la couche de LSEC peuvent médier l'activation primaire des lymphocytes qui se faufilent à travers les sinus. Cependant, il a été démontré que lorsque

l'activation primaire des lymphocytes T CD8+ avait lieu dans le foie plutôt que dans les ganglions lymphatiques, on observait des fonctions effectrices altérées, et ce, plus particulièrement chez les lymphocytes présentant les épitopes de plus grande avidité (Bowen, D.G. et al, 2004). Donc, les lymphocytes T CD8+ ayant les plus fortes chances de contrôler l'infection seraient neutralisés dû à l'environnement particulier du foie.

1.4. Hypothèse et objectifs du projet de maîtrise

Les travaux regroupés dans ce mémoire portent sur la réponse immunitaire cellulaire induite par le VHC et testent 2 hypothèses.

La première hypothèse est que la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP joue un rôle dans la résolution de l'hépatite C lors de la phase aigüe l'infection. On sait que la réponse immunitaire cellulaire T CD4+ et CD8+ lors de la phase aigüe de l'hépatite C est corrélée avec la guérison. Cependant, on ne sait pas si la réponse immunitaire contre l'ARFP contribue à celle-ci, car cet antigène fut découvert récemment et aucune étude portant sur la réponse immunitaire cellulaire n'a été faites lors de la phase aigüe. Comme la séquence codante pour l'ARFP est conservée entre génotypes, située près du site d'initiation de la traduction de la polyprotéine du VHC et que la production de l'ARFP pourrait être indépendante des protéases virales et de l'hôte (n'a pas besoin d'être clivée contrairement à la polyprotéine du VHC), elle pourrait être une des premières protéines exprimées. Par conséquent, elle pourrait être une des premières protéines à induire une réponse immunitaire, et s'avérer une cible intéressante dans la création d'un vaccin ; d'ou l'intérêt de tester la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP durant la phase aigüe.

Pour vérifier cette hypothèse, le premier objectif était de caractériser longitudinalement la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP lors de la phase aigüe à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs). À l'aide de l'ELISpot anti-

interféron- γ la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre l'ARFP fut déterminée et comparée avec celles des protéines core et NS3. Ces 2 dernières protéines furent choisies afin de comparer avec l'ARFP, d'abord parce qu'on sait que la plus grande partie de la réponse immunitaire cellulaire induite par le VHC cible NS3. Celle-ci s'avère donc la candidate de choix pour comparer avec l'ARFP. La protéine core a des acides aminés en communs avec l'ARFP, donc la réponse la réponse immunitaire cellulaire fut évaluée afin discriminer de la réponse induite contre l'ARFP. Comme 2e objectif, nous avons voulu voir si une corrélation existait entre la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP et la résolution de l'infection. Cet objectif fut évalué en comparant les graphiques des patients ayant résolu l'infection spontanément avec ceux ayant développé l'infection chronique. Et comme 3e objectif, nous voulions caractériser les épitopes ciblés sur l'ARFP par la réponse immunitaire.

Dans un autre volet, on a émis comme 2e hypothèse qu'une meilleure connaissance des épitopes ciblés par la réponse immunitaire cellulaire lors de l'infection au VHC de génotype 3 pourrait aider à mieux comprendre la pathogenèse. Il est important de définir de nouveaux épitopes chez le génotype 3a, pour plusieurs raisons: a) la majorité du travail fait concerne le génotype 1, b) ils sont le point de départ dans la mise au point de vaccins thérapeutiques/prophylactiques formulés de peptides immunogéniques, c) ils permettent la mise au point de nouveaux tétramères pour les CMH de classes I ou II, un outil important dans l'analyse et la compréhension de la réponse immunitaire et de la pathogenèse du VHC, d) ils permettent d'approfondir la compréhension de l'importance de la variabilité virale et des mécanismes de fuite de la réponse immunitaire.

Le premier objectif de cette partie fut de déterminer la cartographie des épitopes reconnus chez un patient infecté au génotype 3 qui a résolu spontanément. Notre 2e objectif était de caractériser ces épitopes en déterminant les séquences reconnues par la ainsi que les molécules du CHM II impliquée. Notre 3e objectif étant de comparer avec les épitopes caractérisés pour le génotype 1a afin de vérifier le niveau de conservation de ces

épitopes entre génotypes. Nos buts à long terme étaient de déterminer si la hiérarchie et l'immunodominance des épitopes étaient conservées entre les génotypes du VHC.

CHAPITRE 2. Matériel et méthodes

2.1 Source des échantillons de PBMCs humains : Cohorte St-Luc

En collaboration avec D^{re} Julie Bruneau de l'hôpital St-Luc, les patients ont été recrutés à partir de la cohorte St-Luc, composée d'utilisateurs de drogues intraveineuses (UDIs) (Cox, A.L. et al, 2009). Le but de la cohorte est de gérer les facteurs de risques associés avec les infections au VIH et au VHC, chez les UDIs, afin de mieux comprendre l'épidémie et la dynamique de transmission de ces infections.

Pour qu'un UDI puisse être admis dans la cohorte St-Luc, il doit s'injecter depuis plus de 6 mois, consentir à être suivi, et demeurer à Montréal. Après la première rencontre, ceux testant négatif pour la présence d'anticorps contre le VIH (EIA, AxSYM, Abbott Laboratories, Mississauga, ON, Canada) et le VHC (Cobas Core, Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada, et AxSYM, Abbott Laboratories); et pour la présence de l'ARN viral (Amplicor, Roche Diagnostic) sont invités à revenir pour un suivi tous les 3 mois. De plus, ces tests négatifs doivent être confirmés par le Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ). La confirmation du premier test positif et le génotypage du virus sont aussi effectués par le LSPQ. Lorsqu'un résultat du test de l'ARN du VHC (RT-PCR) est positif pour un patient, celui-ci est suivi à toutes les 3 semaines pendant la 1^{re} année et à toutes les 4 semaines pendant la 2^e année. À chaque visite un prélèvement de 70 mL de sang est effectué. Un total de 104 UDIs est suivi par la cohorte. Cette façon de faire permet de recueillir des échantillons longitudinalement : avant infection, durant la phase aiguë et après résolution ou lors de la persistance de l'infection. Selon le cas, les patients sont classifiés en 2 groupes après 12 semaines (6 mois) de suivi : ceux ayant résolus spontanément et ceux dont l'infection persiste. À 12 semaines, les patients dont l'infection persiste se font offrir la thérapie à l'IFN- α (Figure 6). Dans le présent projet, un total de 31 patients dont les caractéristiques sont détaillées au tableau 1 furent étudiés.

	Résolution Spontanée	Infection persistante
	N = 8	N = 22
Sexe		
M	5	20
F	3	2
Âge		
Fourchette	24-44	21-64
Moyenne	34	35
Médiane	35	32
Génotype		
1a	0	7
1b	0	1
2a	1	1
3a	4	13
N.D.	3	0

Tableau I: Caractéristiques des patients ayant participé à l'étude de la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP

Certains des patients utilisés ont reçu un traitement à l'interféron- α , cependant tous les tests effectués ont été faits sur des PBMCs de ces patients avant qu'ils reçoivent la thérapie.

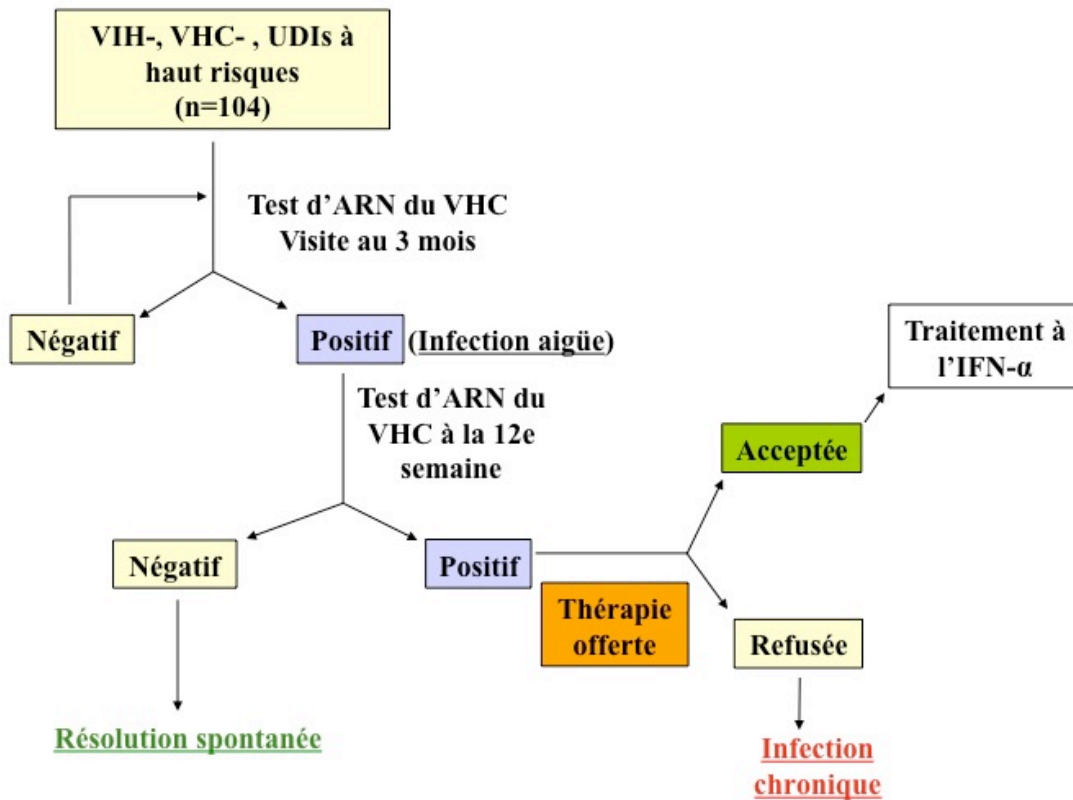


Figure 6 : Schéma d'identification et de suivi des infections aiguës au VHC

Les UDIs, VIH- et VHC-, sont recrutés au sein de la cohorte St-Luc. Aux visites qui se font à une fréquence de 1 fois par 3 mois, les UDIs sont testés pour l'ARN virale du VHC (RT-PCR). Lorsqu'un UDI est diagnostiqué infecté par le VHC (après un test d'ARN viral, confirmé par le laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ)), selon l'élimination spontanée du VHC ou non après 12 semaines de suivi (6 mois), il est classé comme ayant résolu l'infection spontanément ou comme ayant une infection chronique. Dans le cas d'une infection persistante, la thérapie à l'IFN- α est offerte gratuitement *via* la régie de l'assurance maladie du Québec. L'UDI peut refuser ou accepter le traitement.

2.2 Préparation des cellules

Les PBMCs ont été isolées par gradient de densité au Ficoll et cryopréservées dans 10% DMSO (diméthylsulfoxyde) (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), 90% de sérum foetal de veau (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.) à -196°C dans l'azote liquide. Dans les expériences effectuées ci-dessous, les PBMCs ont été préalablement décongelées, puis lavées 2 fois avec du R10. Pour qu'un échantillon de PBMCs soit utilisé, la *viabilité*, déterminée par un compte au bleu trypan (Invitrogen), devait excéder 60%. Le compte de *viabilité* a été fait en ajoutant à un hémacytomètre, une goûte d'un mélange égal de bleu trypan et de suspension cellulaire. Les cellules ont été diluées à concentration désirée dans du AIM-V (Invitrogen), 2% de sérum humain AB inactivé (HS) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) ou dans du RPMI 1640 (Invitrogen), 10% FCS (R10) selon l'expérience. Les précisions sur les milieux de culture utilisés sont données dans les sections correspondantes.

2.3 Préparation des solutions de peptides

Les peptides pour les génotypes 1a (isolat H77) et 3a (isolat K3/650) ont été obtenus grâce au « NIH Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository » (NIAID) sous forme de poudre lyophilisée dans des *vials* contenant une quantité de 1 mg. Ceux utilisés pour le groupe de peptides correspondant à la séquence de l'ARFP consensus, furent obtenus chez Sigma Alrich (Oakville, Ontario, Canada). Les peptides sont d'une longueur de 12-18 mers se chevauchant par 11-12 acides aminés couvrant la totalité de la polyprotéine du virus de l'hépatite C. Dans les tableaux de préparation des peptides (tableaux II et III), ils sont identifiés par leur numéro du catalogue fourni par le NIAID. Pour chaque peptide, une solution mère à 40 mg/mL a été préparée en diluant dans un volume final de DMSO 100% de 25 µL. Afin d'identifier le peptide stimulant spécifiquement les clones, ils furent utilisés individuellement lors des l'ELISpots et dans des expériences de cytométrie en flux à concentration finale 1 µg/mL.

2.4 Préparation des groupes de peptides

Les peptides individuels des génotypes 1a et 3a furent regroupés afin de correspondre à chaque protéine du VHC (tableau II et III). Une solution à 800 µg/mL de groupes de peptides a été aliquotée en distribuant 7.5 µL/*vial* de 1mL (BD biosciences). Pour les ELISpots faites sur des PBMCs humaines, les groupes de peptides ont d'abord été dilués à 6 µg/mL en complétant les tubes (contenant 7.5 µL des groupes de peptides) avec un volume final de 1 mL de milieu de culture AIM-V (Invitrogen). En combinaison avec les PBMCs, 100 µL/puits de ces groupes de peptides ont été utilisés pour cribler la réponse immunitaire cellulaire par ELISpot à concentration finale de 3 µg/mL.

VHC	AA	Peptides	N^{bre} de peptides	Pool de peptides	V_{Peptides} (μL)*	V_{DMSO} (μL)
Core	1-191	6926-6951	26	Pool 1	130	120
E1	192-383	6952-6979	28	Pool 2	140	110
E2	384-746	6980-7031	50	Pool 3	250	0
P7	747-809	7032-7039	8	Pool 4 (39 peptides)	195	55
NS2	810-1026	7040-7070	31			
NS3	1027-1657	7071-7115	45	Pool 5	225	25
		7016-7161	46	Pool 6	230	20
NS4A/B	1658-1972	7162-7206	45	Pool 7	225	25
NS5A	1973-2420	7207-7238	32	Pool 8	160	90
		7239-7270	32	Pool 9	160	90
NS5B	2421-3012	7271-7312	42	Pool 10	210	40
		7313-7354	42	Pool 11	210	40
ARFP	1-160	N-949-N949-25	25	Pool 12	125	125

Tableau II : Organisation des groupes de peptides du génotype 1a, H77

*5 μL de chaque à partir de la solution mère à 40 mg/mL

*Volume final de 250 μL (peptides et DMSO), à concentration de 800 μg/mL

VHC	AA	Peptides	N^{bre} de peptides	Pool de peptides	V_{Peptides} (μL)*	V_{DMSO} (μL)
Core	1-191	N838, 1-29	29	Pool 1	130	120
E1	192-384	N839, 1-28	28	Pool 2	140	110
E2	385-754	N840, 1-50	50	Pool 3	250	0
P7	755-818	N841, 51-57	7	Pool 4 (39 peptides)	195	55
NS2	819-1036	N842, 1-33	33			
NS3	1037-1668	N843, 1-48	48	Pool 5	225	25
		N843, 49-97	49	Pool 6	230	20
NS4/A	1669-1723	N844, 1-7	45	Pool 7	225	25
NS4/B	1724-1985	N845, 1-39	39	(46 peptides)		
NS5A	1986-2438	N845, 1-36	32	Pool 8	160	90
		N845, 37-72	32	Pool 9	160	90
NS5B	2439-3030	N846, 1-45	42	Pool 10	210	40
		N846, 46-90	42	Pool 11	210	40
ARFP	1-142	N950, 1-21	25	Pool 12	125	125

Tableau III : Organisation des groupes de peptides du génotype 3a, K3/650

*5 μL de chaque à partir de la solution mère à 40 mg/mL

*Volume final de 250 μL (peptides et DMSO), à concentration de 800 μg/mL

2.5 ELISpot anti-interféron- γ effectué sur les PBMCs humaines

La membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF), des puits des plaques de 96 puits, MultiScreen®-IP white-walled plate (Millipore; Bedford, MA, É.-U.) a été traitée avec 17 μ L d'éthanol (EtOH) (SAQ, QC, Canada) 35% pendant 45s. Ensuite, les plaques ont été lavées en faisant 3 lavages avec du tampon « phosphate buffered saline » (PBS) (Wisent). Un volume de 100 μ L/puits d'une solution d'anticorps monoclonal de capture, anti-IFN- γ humain 1 μ g/mL (BD biosciences) (Clone NIB42) dilué dans du PBS a été ajouté aux plaques qui furent incubées de 16-18 heures à l'obscurité, à 4°C.

Au jour 2, les plaques préalablement lavées 5 fois au PBS ont été bloquées en incubant 1 h à 37 °C avec 200 μ L/puits de R10. Les plaques ont été lavées 5 fois au PBS. Ensuite, 100 μ L/puits de solution des groupes de peptides a été ajouté afin d'obtenir la concentration finale de 3 μ g/mL. Une quantité de 200 000 PBMCs/puits a été ajoutée en distribuant 100 μ L/puits de cellules concentrées à 2×10^6 cellules/mL dans du AMI-V, 2% HS. . Deux types de contrôles (Ctrl) négatifs ont été réalisés. Le premier était des puits ne contenant que du milieu de culture. Le second était des PBMCs non stimulées. Deux contrôles positifs furent utilisés. Le premier consistait en un groupe de peptides appelé CEF. Ce groupe correspond à 32 épitopes HLA de classe I de 8-12 acides aminés de long dont les séquences sont dérivées des virus du Cytomégalovirus, du virus Epstein Barr (EBV) et de l'influenza (Flu) (NIAID). La plupart des individus répondent positivement (Currier J.R., 2002). Le second était une solution de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) et d'ionomycine (Sigma) utilisée respectivement à une concentration finale de 50 ng/mL and 1 μ g/mL. Les PBMCs traitées avec des contrôles positifs ont constamment donné un résultat positif tel qu'attendu. Tous les groupes de peptides et les contrôles ont été testés en duplicata. Les plaques ont été incubées 36 h à 37°C, 5 % CO₂.

Au jour 3, à l'aide du laveur de plaques automatisé Ultrawash PLUS™ (Dynerx, Chantilly, VA, É.-U.), les plaques furent lavées 9 fois au PBS-Tween 0,05% (Sigma).

L'anticorps biotinylé anti-IFN- γ (Clone 4S.B3) (BD Biosciences), prédilué à 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du PBS-0.5% d'albumine de sérum humain (HSA)(Wisent), fut ajouté en distribuant 100 $\mu\text{L}/\text{puits}$. Les plaques ont été incubées 2 h dans l'obscurité à température ambiante. Puis, les plaques ont été lavées 7 fois au PBS-Tween 0,05%, puis 3 fois avec du PBS en utilisant l'aspirateur de plaques (Millipore). Le conjugué, streptavidine-phosphatase alcaline (Strep-AP) (Bio-Rad), prédilué 1 :1000 dans du PBS-BSA 0,5%, a été ajouté en distribuant 100 $\mu\text{L}/\text{puits}$ et les plaques ont été incubées 1 h dans l'obscurité à température ambiante. Ensuite, celles-ci ont été lavées 7 fois au PBS-Tween 0,05% avec le laveur automatisé, puis 3 fois avec du PBS et une fois avec de l'eau nano pure à l'aide de l'aspirateur de plaque. Pour développer la plaque, le kit « AP Conjugate Substrate » (Bio-Rad) a été utilisé, le substrat 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyphosphate/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) (Bio-Rad) a été ajouté en distribuant 100 $\mu\text{L}/\text{puits}$, et incubé dans l'obscurité, à température ambiante pour une durée de 6 min. Pour arrêter la réaction, la plaque a été rincée avec de l'eau courante pendant 2 min et ensuite séchée avant de faire l'acquisition avec le lecteur de plaque « CTL-ImmunoSpot® S5 UV Analyzer » (Cellular Technology Ltd., Shaker Heights, OH, É.-U.). Le compte des « spots » a été fait à l'aide du logiciel CTL ImmunoSpot® Academic Software Version 4.0 (Cellular Technology Ltd.) (Figure 7). Pour qu'un résultat soit considéré positif, la moyenne des duplicatas devait excéder le seuil de positivité de 50 « spots forming cells »(SFC)/million PBMCs prédéterminés, tel que décrit précédemment (Bain, 2004; Boulet S, 2006). Comme deuxième critère, le nombre de « spots » devait être supérieur à trois fois celui du contrôle négatif contenant les PBMCs non-stimulées, tel que décrit précédemment (Bain, 2004).

2.6 ELISpot anti-interféron- γ effectué sur les lignées de clones T

Cet essai a été fait de la même manière que celui effectué pour les PBMCs d'humains à l'exception des modifications suivantes. Au jour 2, des lymphocytes B immortalisés par EBV (BLCL) autologues furent utilisées afin de présenter les peptides. Elles furent diluées à une concentration de 500 000 cellules/mL dans du AMI-V, 2% HS

afin d'ajouter 50 000 cellules/puits en distribuant 100 μL /puits. Les lignées cellulaires de clones T furent diluées à une concentration de 10 000 cellules/mL dans du AMI-V, 2% HS afin d'ajouter 1000 cellules/puits en distribuant 100 μL /puits. Enfin, dans cet essai au lieu d'utiliser des groupes de peptides, des peptides individuels furent testés à une concentration finale de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans un volume final de 205 μL en ajoutant 5 μL /puits d'une solution intermédiaire de peptides concentrée à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les contrôles positifs utilisés étaient le groupe de peptides contre lequel les clones répondaient initialement et aussi le PMA/ionomycine. Les cellules ont été incubées pour une durée de 16-18 heures.

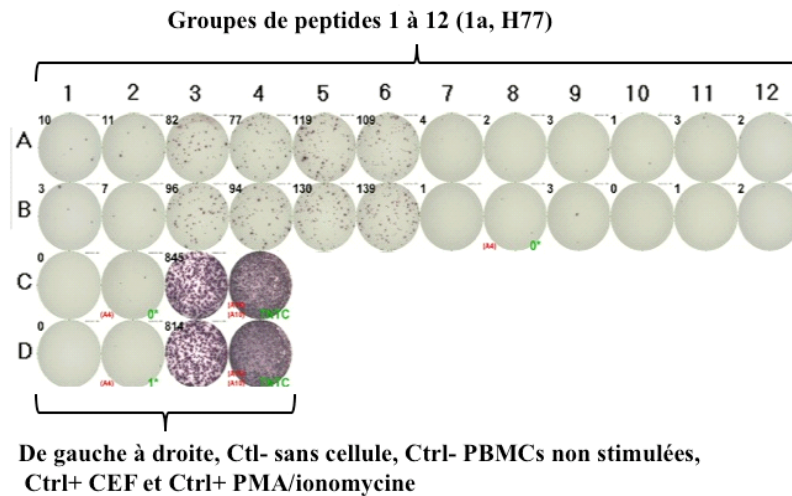
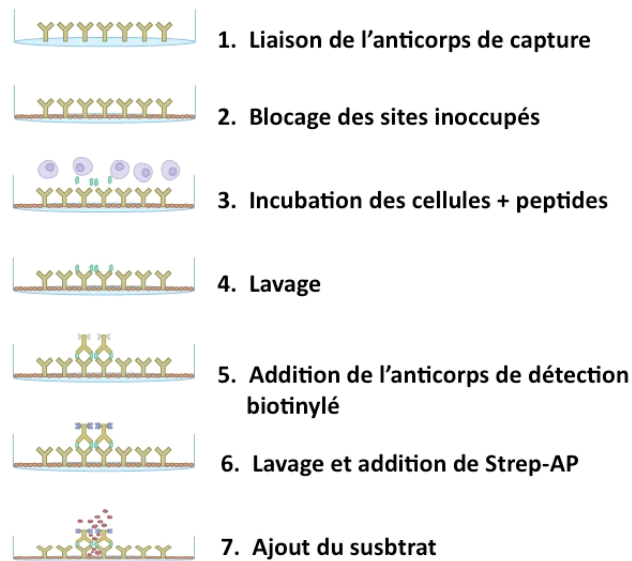


Figure 7 : ELISpot anti-interféron- γ

Dans cet exemple représentatif, la plaque fut traitée tel qu'illustré et décrit en détail dans la section « ELISpot anti-interféron- γ effectué sur les PBMCs humaines » de la page 38. Les PBMCs d'un UDI infecté par VHC de génotype 1a furent testées en combinaison avec les groupes de peptides 1 à 12, génotype 1a, isolat H77 à une concentration finale de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$

2.7 Génération de lignées lymphocytaires T

Un total de 4×10^6 PBMCs humaines ont été concentrées dans un volume de 400 μL de milieu de culture RPMI 1640, 10% sérum humain inactivé (R10/HS). La moitié de cette suspension cellulaire (200 μL) a été chargée avec le groupe de peptides à concentration finale de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans un volume final de 250 μL , puis incubée 1h à 37°C, 5% CO_2 dans un tube conique à centrifugation de 15mL en polypropylène (BD biosciences). Pendant ce temps, l'autre moitié des PBMCs (200 μL) a été diluée dans un volume final de 1 mL de R10/HS et transférée dans un puits d'une plaque de 24 puits en polystyrène (BD biosciences), puis incubée. Les PBMCs chargées avec les peptides ont été lavées avec 10 mL de RPMI 1640 (Invitrogen). Ensuite, elles furent mises en suspension dans 1 mL de R10/HS puis ajoutées à l'autre moitié de PBMCs non chargée afin d'obtenir une concentration de 4×10^6 cellules/mL dans 2 mL/puits. Après 3-5 jours, l'interleukine-2 humaine recombinante (IL-2) (NIAID) fut ajoutée à concentration finale de 20 UI/mL. Tous les 3 jours, la moitié du milieu de culture fut remplacée par du milieu de culture frais (R10/HS, IL-2 40 UI/mL). Après 7-10 jours d'incubation, une 2e stimulation a été faite de la manière décrite ci-dessus à l'exception que 1×10^6 cellules de la lignée furent utilisées avec 1×10^6 PBMCs autologues irradiées (3000 rad) préchargées avec les peptides. Après 7 à 10 jours, la lignée de clones T étaient restimulée si la spécificité obtenue suite à l'analyse par cytométrie en flux du marquage intracellulaire à l'interféron- γ était inférieure à 10% (voir les sections : Cytométrie en flux, anticorps et réactifs; et Marquage intracellulaire de l'interféron- γ des clones ou lignées lymphocytaires). Selon le phénotype, CD3+, CD4+, CD8- ou CD3+, CD4-, CD8+, les lignées lymphocytaires T furent purifiées par sélection négative à l'aide de billes magnétiques anti-CD4 ou anti-CD8 (selon le cas).

2.8 Purification des lignées lymphocytaires T par sélection négative

Afin de purifier les lymphocytes T CD4+ et éliminer les T CD8+ non spécifiques (après vérification par ICS et cytométrie en flux) des lignées lymphocytaires (vérifiées par

cytométrie en flux), CD3+, CD4-, CD8+, nous avons utilisé des billes magnétiques dont la surface contenait des anticorps anti-CD8. Le lavage des billes a été fait dans un tube à tri (BD biosciences) contenant 10 mL de tampon d'isolation (PBS, 0,1% sérum bovin fœtal (FBS)) auquel a été ajouté 50 μ L de billes DYNAL[®] CD8 (Invitrogen) dont la concentration était de 4×10^8 billes/mL. Le tout a été bien mélangé par inversion et placé sur l'aimant 1 min. Le surnageant a été aspiré et les billes ont été ensuite mises en solution dans 1 mL de tampon d'isolation contenant 1×10^7 cellules de la lignée lymphocytaire (Ratio 1×10^7 cellules/50 μ L de bille). Le mélange cellules/billes fut transféré dans un tube à centrifugation de 15 mL (BD biosciences) et a été placé sous lente rotation durant 30 min à température ambiante. Puis, 9 mL de tampon d'isolation fut ajouté au mélange cellules/bille qui a été placé sur l'aimant 1 min. Le surnageant contenant les lymphocytes T CD4+ fut transféré dans un autre tube à tri, mélangé et placé sur l'aimant une fois de plus. Le surnageant fut centrifugé et le culot de lymphocytes T CD4+ resuspendu dans du milieu à clones T (RMPI 1640, 10% HS, 40 UI/mL IL-2) à concentration de 1×10^6 cellules/mL. Les cellules ont été incubées dans une plaque à culture cellulaire de 24 puits.

2.9 Culture cellulaire des BLCLs, des lignées lymphocytaires et des clones T

Un total de 5×10^6 BLCLs ont été décongelées et incubées dans du R10 à concentration finale de $0,1 \times 10^6$ cellules/mL dans des flacons de 75cm² ou de 150cm² (BD biosciences) selon le nombre de cellules. Un passage des BLCLs a été fait tous les 3-4 jours en diluant à concentration finale de $0,1 \times 10^6$ cellules/mL.

Les lignées lymphocytaires et les clones T, furent maintenus en culture dans du milieu de culture pour clones T à concentration de 1 à 2×10^6 cellules/mL dans des plaques de 24 puits, des flacons de 75 cm² ou de 150 cm² selon le nombre de cellules atteint. La moitié du milieu de culture a été remplacée avec du milieu pour clones T à tous les 3-4 jours. Après 7-10 jours, les cellules ont été amplifiées non spécifiquement, en plaque à culture cellulaire de 24 puits, en combinant 1×10^6 clones/ou cellules de lignée

lymphocytaire et 2×10^6 PBMCs hétérologues pré-irradiées à 3000 rad, dans 2 mL de milieu pour clones contenant 0,02 $\mu\text{g/mL}$ d'anticorps anti-CD3 humain (clone X35) (Beckman Coulter, Fullerton, CA, É.-U.).

Avant de procéder à l'essai de prolifération cellulaire à la thymidine ^3H , une amplification non spécifique a été réalisée de manière à amplifier des clones purs. Pour chaque lignée lymphocytaire préalablement diluée à 50 cellules/mL dans du R10, 5 plaques de 96 puits à fond ronds pour culture cellulaire (BD biosciences) ont étéensemencées à 100 $\mu\text{L/puits}$ (5 cellules/puits). Ensuite, 100 $\mu\text{L/puits}$ (50 000 cellules/puits) de PBMCs hétérologues fraîchement irradiées et concentrées à 5×10^5 cellules/mL dans du R10, 0,05 $\mu\text{g/mL}$ d'anticorps anti-CD3 humain, 40 UI/mL IL-2, furent distribuées dans les plaques. Celles-ci furent incubées à 37 °C, 5 % CO_2 . Pendant l'amplification, les cellules furent maintenues en changeant la moitié du milieu de culture (100 μL) avec du milieu de culture frais (R10 RMPI 1640, 10% FCS, 40 UI/mL IL-2) à tous les 3-4 jours. Lorsque la densité cellulaire maximale/puits fut atteinte (200-150 000 cellules/puits), le criblage a été fait par essai de prolifération à la thymidine ^3H .

2.10 Criblage des lignées lymphocytaires par essai de prolifération à la thymidine ^3H

Afin de déterminer lesquels des clones préalablement amplifiés étaient spécifiques contre les groupes de peptides, l'essai de prolifération cellulaire à la thymidine ^3H a été effectué tel que décrit ci-dessous. À partir des plaques de 96 puits à fond ronds, les clones T ont été mis en suspension, puis 2 répliques de chaque plaque ont été faites dans des plaques de 96 puits à fond plats (BD biosciences) en distribuant 50 $\mu\text{L/puits}$ de suspension cellulaire (approximativement 50 000 clones/puits). Dans les plaques mères, un volume de 100 $\mu\text{L/puits}$ de milieu de culture frais (R10 RMPI 1640, 10% FCS, 40 UI/mL IL-2) a été ajouté et les plaques mères furent remises à l'incubateur pour utilisation ultérieure.

En parallèle, des BLCLs autologues ont été préparées pour l'essai. Dans un tube à centrifugation de 50 mL (BD biosciences), la première moitié de BLCLs ($2,5 \times 10^7$) ont été chargées avec le groupe de peptides en incubant pendant 1 h (37°C , 5% CO_2) dans 5 mL de R10, contenant 1 $\mu\text{g/mL}$ de peptides. L'autre moitié de BLCLs ($2,5 \times 10^7$) fut traitée comme la première, mais sans peptide. Après l'incubation, les BLCLs ont été irradiées à 15 000 rad, puis centrifugées et remises en solution dans 50 mL de R10. Elles furent distribuées à 100 $\mu\text{L/puits}$ (50 000 BLCLs) de manière à avoir 2 groupes de plaques, non stimulées et stimulées. Un volume 50 $\mu\text{L/puits}$ de R10 a été ajouté aux plaques pour compléter à 200 μL . Les plaques ont été incubées 48 h, puis la thymidine ^3H (MP biomedical, Solon, OH, É.-U.) concentrée à 1 mCi/mL (diluée dans du PBS) a été ajoutée à concentration finale de 5 $\mu\text{Ci/mL}$. Les plaques ont été incubées 16-18 h.

Le contenu des plaques a été transféré sur des membranes de fibre de verre à l'aide du récolteur « MicroBeta FilterMate-96 Harvester » (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, É.-U.). Les membranes furent séchées aux micro-ondes 2 min, transférées dans le support de comptage (OmniFilter Assemblies, PerkinElmer), 30 $\mu\text{L/puits}$ de liquide à scintillation Microscint O (PerkinElmer) a été déposé, et les supports à filtres furent scellés avec une pellicule plastique, « Axysel sealing film » (Axygen, Mississauga, ON, Canada). Par la suite, le compte de radioactivité a été déterminé pour chaque plaque à l'aide du compteur de radio activité TopCount NXT (PerkinElmer). L'indice de stimulation a été calculé selon l'équation suivante : $\text{Compte (CPM) des clones stimulés} / \text{Compte (CPM) des clones non stimulés}$. Pour qu'un résultat soit considéré positif, un clone devait avoir produit un compte de radioactivité supérieur à 4 000 CPM et un indice de stimulation égale ou supérieur à 3.

À partir des plaques mères, les clones correspondant à ces critères ont été amplifiés en plaques de culture cellulaire de 24 puits (BD biosciences) tel que décrit dans la section « culture cellulaire des BLCLs, lignées lymphocytaires et clones T ». Tout au long du processus d'amplification des clones, la moitié du milieu de culture a été remplacée par du

milieu de culture pour clones frais à tous les 3-4 jours. Lorsqu'un total de plus de 1×10^7 cellules fut atteint, 2 *vials* de 3×10^6 clones furent cryopréservés pour usage ultérieur.

2.11 Cytométrie en flux, anticorps et réactifs

Ces anticorps directement conjugués ont été utilisés: CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Clone G4.18), CD4-Pacific Blue (Clone RPA-T4), IFN γ -Alexa700 (Clone B27) (tous de BD Biosciences) et CD8-ECD (Clone CD8-PC5) (Beckman Coulter). La *viabilité* des cellules a été vérifiée en utilisant le kit « Aqua Live/Dead cell Stain kit » (Molecular Probe, Eugene, OR, É.-U.). Les données de cytométrie en flux ont été produites en utilisant le système de cytométrie BD LSRII (BD Biosciences) équipé avec les lasers bleu (488 nm), rouge (633 nm) et violet (405 nm) en combinaison avec le logiciel d'analyse FACSDiva (BD Biosciences). Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel FlowJo version 8.8.2 (TreeStar, Inc., Ashland, OR, É.-U.).

2.12 Marquage intracellulaire de l'interféron- γ des clones ou lignées lymphocytaires

Dans des plaques de 96 puits à fond rond, 200 000 cellules/puits provenant des lignées cellulaires ou des clones ont été incubées en combinaison avec 100 000 BLCLs autologues/puits avec ou sans les peptides d'intérêt ($1 \mu\text{g/mL}$). Après 1h de stimulation, $10 \mu\text{g/mL}$ de brefeldine A a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 16h. Les cellules ont été lavées avec du tampon à FACS (PBS-1% FCS, 0,1% azoture de sodium (Sigma)). Le marquage pour la *viabilité* et les antigènes de surface a été fait (kit de *viabilité*, anti-CD3-FITC, anti-CD4-PB et anti-CD8-ECD) durant 30 min à 4°C à l'obscurité. Les cellules ont été lavées avec le tampon FACS et perméabilisées avec le kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) tel qu'indiqué par le manufacturier. Ensuite, le marquage intracellulaire des cellules a été fait avec l'anticorps anti-IFN γ pendant 30 min. Les cellules ont été lavées 2 fois avec le tampon « Perm Wash » (BD Biosciences) et fixées avec le tampon de fixation (PBS, formaldéhyde 1% (Sigma)). Pour vérifier la production

d'IFN γ , les cellules ont été séparées en 2 groupes : cellules *viables*, CD3+, CD4+, CD8- ou cellules *viables*, CD3+, CD4-, CD8+. Les pourcentages de production d'IFN- γ ont été déterminés en ajustant d'abord le bruit de fond sur les cellules non stimulées puis en déterminant ensuite le pourcentage d'IFN- γ sur les cellules stimulées.

2.13 Essai de restriction du CMH

D'abord, la restriction du CMH a été déterminée en vérifiant le pourcentage d'inhibition de la production d'IFN- γ à l'aide des anticorps anti-HLA de classe II : L243 (anti-HLA-DR), IVD-12 (anti-HLA-DQ), IVA-12 (anti-HLA-DR, DP, DQ), et avec l'anticorps anti-HLA de classe I W6/32 (anti-HLA-A, B, C) (utilisé comme contrôle négatif). Ces anticorps furent purifiés à partir des surnageants en utilisant les colonnes « Hitrap Protein G HP (GE Healthcare, AB, SE-751 84 Uppsala, Suède) selon les instructions du manufacturier. Les hybridomes ont été obtenus chez « American Type Culture Collection » (ATCC) (Manassas, VA, É.-U.). La réaction croisée entre les anticorps a été vérifiée auparavant par cytométrie en flux (Shoukry, 2004). Les conditions expérimentales et d'analyse ont été identiques à celles décrites dans la partie « Marquage intracellulaire à l'interféron- γ des clones » à l'exception de quelques différences décrites ci-après. Les BLCLs ont été préalablement incubées 30 min avec les anticorps à 10 $\mu\text{g/mL}$, puis lavées avec du milieu de culture avant d'être chargées avec les peptides à 1 $\mu\text{g/mL}$. Après avoir ajouté la brefeldine A, les cellules ont été incubées 8 h. Suivant l'identification des molécules du CMH de classe II impliquée, la détermination des allèles impliqués a été effectuée en comparant les résultats obtenus avec les BLCLs autologues (DRB1*070101/070102 (DR7) et DRB1*090102 (DR9)) avec ceux des BLCLS hétérologues dont les allèles correspondaient partiellement à celles des BLCLs autologues: DR7 ou DR9.

2.14 Analyses statistiques

Afin de vérifier si la différence entre les résultats entre les temps d'infection testés par ELISpot était significative, un simple test t a été effectué. Les données furent considérées comme étant statistiquement significatives pour une valeur de $P < 0,05$.

CHAPITRE 3. Résultats

3.1 Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire contre la protéine ARFP

Des études ont rapporté que le génome du VHC contient un cadre de lecture +1, qui chevauche le cadre de lecture principal, dans la région hautement conservée de la protéine core (Walewski, J.L. et al, 2001 ; Xu, Z. et al, 2001). La protéine ARFP, de l'anglais « Alternate Reading Frame Protein », est exprimée à partir de ce dernier. Sa séquence exacte, sa fonction biologique ainsi que son mode d'expression restent mal connus. Cependant, il a été démontré que dans l'ORF du cadre de lecture +1, qui permettrait l'expression de l'ARFP, on retrouve des éléments conservés, de tiges-boucles, qui sont importants pour l'infectivité du VHC (McMullan, L.K. et al, 2007). De plus, des anticorps et des lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques ciblant cette protéine ont été détectés chez les patients atteints par l'hépatite C chronique (Bain, C. et al, 2004 ; Komurian-Pradel, F. et al, 2004; Troesch, M. et al, 2005). Cependant, l'importance de la réponse immunitaire contre l'ARFP dans la résolution de l'infection au VHC, lors de la phase aiguë, n'a jamais été évaluée chez l'homme. C'est ce qui nous a amenés à poser l'hypothèse que la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP joue un rôle dans la résolution de l'hépatite C lors de la phase aiguë l'infection. Afin de vérifier sa véracité, les objectifs suivants ont été posés :

- Caractériser longitudinalement la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP lors de la phase aiguë, à l'aide de l'ELISpot anti-interféron- γ en comparant avec celle des protéines core et NS3.
- Déterminer si une corrélation existe entre la réponse immunitaire contre l'ARFP et la guérison de l'hépatite C.
- Caractériser les épitopes ciblés par la réponse immunitaire cellulaire.

3.1.1 Criblage de la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP avec des groupes de peptides

Afin de caractériser longitudinalement la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP lors de la phase aiguë, à l'aide de l'ÉLISpot anti-interféron- γ , nous avons analysé la réponse immunitaire cellulaire contre le VHC, pendant la phase aiguë de l'infection, sur un total de 30 patients (voir matériel et méthodes, tableau I). Les PBMCs des patients furent testées longitudinalement avant infection, au premier, au troisième et après six mois d'infection. Un total de 76 échantillons furent testés. Les périodes mentionnées ci-dessus furent choisies afin de pouvoir comparer les temps avant l'infection avec ce qui est observé pendant la phase aiguë (premier et troisième mois) et au temps où le patient est classé comme ayant une infection persistante ou ayant guéri (après six mois) selon la virémie. Dans la plupart des cas, les patients atteints du VHC développent une réponse immunitaire cellulaire détectable à partir du 1^{er} mois après infection. Par la suite, la force de celle-ci peut augmenter pour atteindre un plateau après 6 mois, dans certains cas après 1 an (Cox, A.L. et al, 2005).

Comme antigène, 4 groupes de peptides furent utilisés (voir matériel et méthodes). Leurs séquences d'acide aminé (a.a.) étaient dérivées des génotypes 1a, isolat H77 et génotype 3a, isolat K3/630. Chez les patients où le génotype du VHC n'a pu être déterminé, nous avons utilisé les peptides correspondants au génotype 3a étant donné que dans notre cohorte, plus de 50% des patients sont infectés par ce dernier. Dans les cas d'infections avec d'autres génotypes que 3a et 1a, les peptides ayant la plus grande homologie furent utilisés. D'abord, un premier groupe correspondant à la protéine core fut sélectionné, car l'ARFP et core ont leurs dix 1ers acides aminés en communs dans le cas de l'ARFP/F, et partagent 47% d'homologie dans le cas de L'ARFP/DF. Il s'avérait essentiel de les tester en parallèle afin de pouvoir distinguer la réponse dirigée contre core de celle dirigée contre l'ARFP, et de pouvoir déterminer la présence d'épitopes communs aux 2

protéines. Ensuite, 2 autres groupes de peptides (NS3-1 et NS3-2), couvrant la totalité de la protéine NS3, furent utilisés. La protéine NS3 fut choisie pour plusieurs raisons : a) parce qu'elle compte pour 21% de la séquence codante du VHC, b) parce qu'elle comporte de nombreuses régions immunodominantes, et c) parce qu'elle est la plus immunogénique de toutes (Diepolder, H.M. et al, 1995 et 1997; Day, C.L. et al, 2002; Lauer, G.M. et al, 2004 et 2005; Gerlach, J.T. et al, 2005 ; Schulze zur wiesch, J. et al, 2005 ; Cox, A.L. et al, 2005, Smyk-Pearson, S. et al, 2006). Enfin, le dernier groupe de peptides utilisé dans l'étude correspond à la protéine d'intérêt de cette étude, soit l'ARFP.

Tout d'abord, lorsque l'on observe les résultats des l'ELISpots anti-interféron- γ effectués chez les patients ayant résolu l'infection (figure 8a), pour NS3 on obtient des médianes des « spots forming cells » (SFC)/million PBMCs qui dépassent le seuil de positivité (50 SFC/million PBMCs), et ce, pour tous les temps d'infection (un mois, trois mois et six mois ou plus). Par contre, ce n'est pas le cas pour core et l'ARFP. Cependant, malgré les médianes qui sont inférieures au seuil de positivité, on observe la présence de réponses immunitaires cellulaires positives contre core chez certains patients après un, trois ou six mois d'infection. Contrairement à core, la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP n'a pu être détectée, et ce, pour tous les temps d'infection. Un test t confirme ces observations en comparant avant et après 3 mois d'infection, pour l'ARFP la différence entre les médianes n'est pas significative ($P=0,3233$) alors qu'elle l'est pour NS3 (groupe NS3-1) ($P= 0,0256$). Donc, si on compare les médianes, les patients qui guérissent de l'hépatite C développent une réponse immunitaire cellulaire dans la plupart des cas contre NS3. Cependant pour les autres antigènes testés la fréquence des PBMCs spécifiques est plus basse, tel qu'observée pour core, sinon considérée négative tel qu'observé pour l'ARFP.

Lorsqu'on observe les résultats des l'ELISpots anti-interféron- γ effectués chez les patients ayant une infection persistante au VHC (figure 8b), on obtient des médianes inférieures au seuil de positivité (50 SFC/million PBMCs); et ce, pour tous les temps

d'infection (un mois, trois mois et six mois ou plus) et pour tous les antigènes testés (core, NS3 et l'ARFP). Cependant, individuellement certains patients démontrent des réponses immunitaires cellulaires positives pour core et NS3. En contraste avec les autres antigènes, l'ARFP n'induit pas de réponse positive détectable chez les patients ayant une infection persistante tout comme ce qui est observé chez les patients qui ont guéri spontanément. D'ailleurs, lorsque l'on compare les médianes de l'ARFP et NS3 (groupe NS3-1) avant et après 3 mois d'infection, on observe que c'est statistiquement non significatif pour l'ARFP ($P= 0,3288$) et significatif pour NS3 ($P= 0,0294$). Enfin, les médianes lors des infections qui persistent sont plus faibles que celles des infections résolues spontanément. Individuellement, la fréquence des individus démontrant une réponse immunitaire positive lors de l'infection persistante est beaucoup plus faible que chez ceux qui guérissent naturellement. Comme 2^e objectif, nous avons à déterminer si une corrélation existe entre la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP et la résolution de l'infection aigue. Étant donné qu'il ne fut pas possible de détecter de réponse positive, nous ne pouvons nous prononcer sur cet objectif. En conclusion, bien que le nombre de patients testés du groupe ayant résolu l'infection est plus petit que celui du groupe ayant une infection persistante, on n'observe pas de différence pour la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP, et ce, pour tous les temps d'infection. Ceci suggère fortement que la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP ne joue pas de rôle majeur lors de la résolution de l'infection aigue VHC.

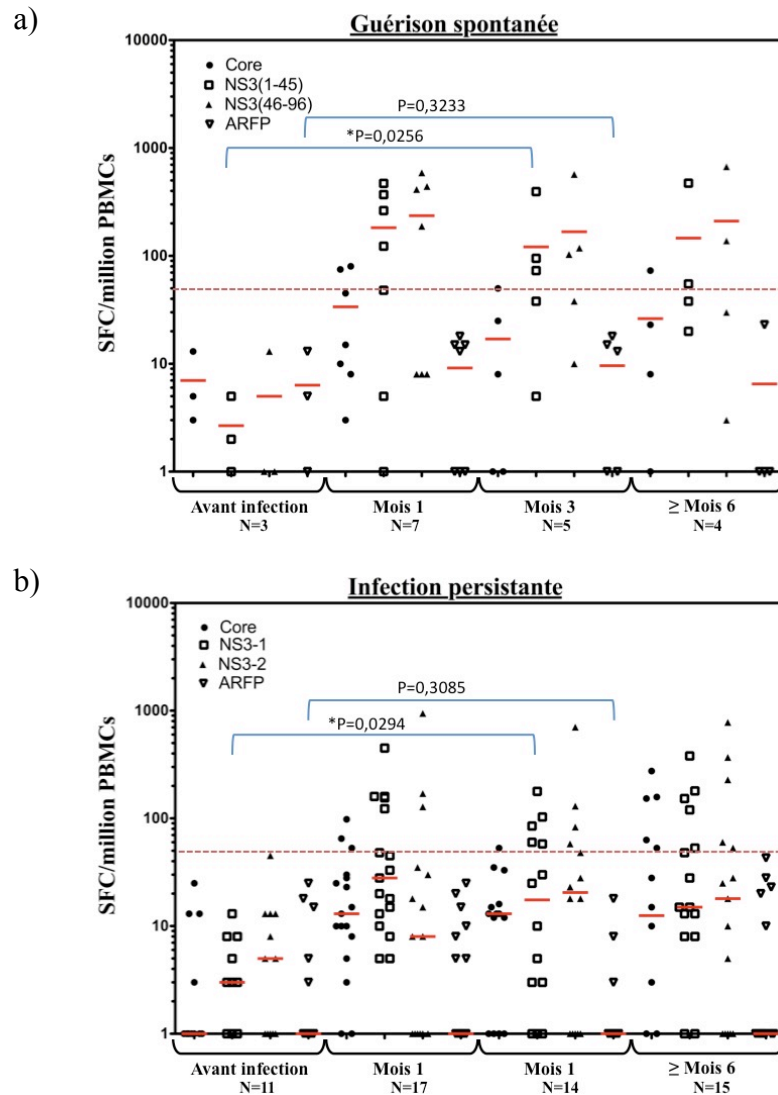


Figure 8 : Détection de l'IFN- γ produit par les cellules spécifique à core, NS3 et l'ARFP chez des patients ayant résolues l'hépatite C ou non.

L'ÉLISpot anti-IFN- γ a été effectué. Des PBMCs de patients en a) ayant résolu l'infection, et en b) ayant développé une infection persistante furent testés. Pour chaque temps d'infection, le nombre de patients testés (N) est indiqué. Le nombre de cellules produisant de l'IFN- γ par millions de PBMCs après stimulation *in vitro* fut évalué. Les médianes ont été calculées à chaque temps (avant infection, à un mois, à trois mois et à six mois ou plus),

pour tous les antigènes testés (core, NS3-1, NS3-2 ou l'ARFP). La ligne rouge pointillée représente le seuil de positivité, fixé à 50 SFC/millions PBMCs.

3.1.2 Criblage de la réponse immunitaire contre l'ARFP en utilisant l'ARFP mut8Δ11 recombinante

Afin de maximiser les chances de détecter une réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP, nous avons aussi utilisé la protéine produite de façon recombinante. La logique étant que la protéine recombinante peut être internalisée, traitée *via* le protéasome et ensuite présentée de façon optimale *via* le CMH de classe I ou encore internalisée dans des endosomes où des protéases activées par le pH acide peuvent générer des peptides qui sont présentés de façon optimale par le CMH de classe II. Au contraire, lorsque l'on utilise des peptides ceux-ci se chargent directement à la surface des CMH de classe I ou II. Donc, en utilisant une protéine complète comme antigène, il est possible de générer des peptides différents et meilleurs pour l'induction de la réponse immunitaire cellulaire. La protéine ARFP recombinante, l'ARFP mut8Δ11, fut généreusement fournie par le Dr Hugo Soudeyns. Sa séquence est dérivée du génotype 1a isolat TVC33, contrairement aux peptides basés sur la séquence du génotype 1a, isolat H77. Il en résulte quelques différences observables à la figure 9. En ne tenant pas compte de la délétion de 11 acides aminés en C-terminal de l'ARFP mut8Δ11, les différences sont les suivantes : V89A, G91D, A105V, L125S, L142P et K158R. De plus, il faut mentionner la présence d'une séquence d'acide aminé étrangère à l'ARFP en N-terminal qui contient 6 histidines et des sites de clivage pour des protéases (thrombine et l'entérokinase) qui ne sont pas inclus sur la figure 9.

Au moyen de l'Elispot interféron- γ , un total de 11 patients furent testés avec l'ARFP mut8Δ11 (résultats non montrés). Le patient 4545-HABT, ayant une infection persistante au VHC, génotype 2b, fut le seul à démontrer une réponse positive, détectée de manière reproductible sur 3 temps de prélèvement différents : 2, 4 et 15 mois après

détection de la virémie (figure 10) ; et ce en utilisant l'ARFP mut8 Δ 11 dont la séquence est dérivée du génotype 1a. Afin de caractériser le/les épitope(s) ciblé(s) par la réponse immunitaire cellulaire chez un patient infecté au génotype 2b réagissant de façon croisée avec l'ARFP mut8 Δ 11, nous avons procédé à la création de lignées cellulaires spécifiques à partir des PBMCs.

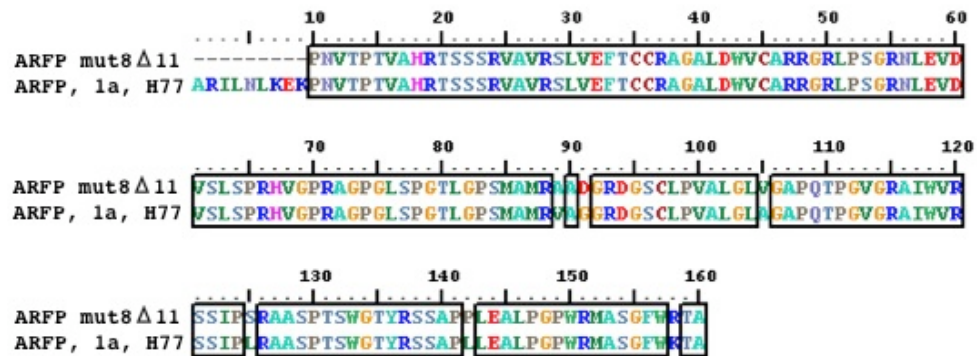


Figure 9 : Alignement des séquences d'aides aminées de l'ARFP, génotype 1a isolat H77 et de l'ARFP mut8 Δ 11, isolat TVC33.

Les différences entre les séquences sont les suivantes : V89A, G91D, A105V, L125S, L142P et K158R. Sur l'ARFP mut8 Δ 11, il y aussi l'absence de 11 a.a. en C-terminal et l'ajout d'une séquence de 6 histidines et des sites de clivage pour des protéases (thrombine et l'enterokinase) (n'apparaît pas sur l'alignement).

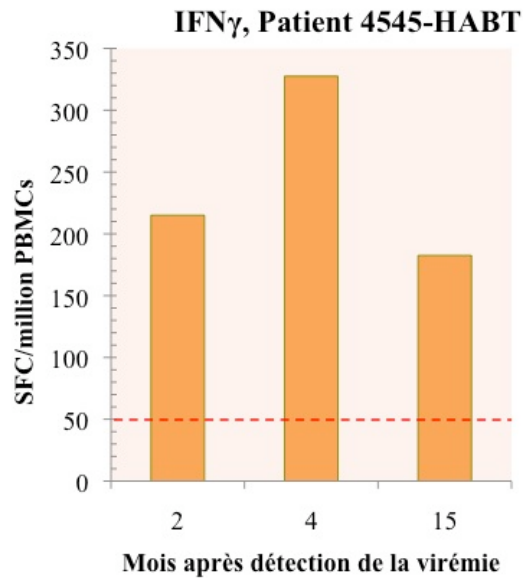


Figure 10 : Production longitudinale l'IFN- γ , en réponse à la protéine recombinante ARFP mut8 Δ 11, pour le patient 4545-HABT infecté au génotype 2b.

Le criblage de la réponse immunitaire cellulaire contre la protéine recombinante l'ARFP mut8 Δ 11, a été fait à partir de PBMCs à l'aide de l'ELISpot anti-IFN- γ . Le nombre de cellules sécrétant de l'IFN- γ par million de PBMCs après stimulation *in vitro* avec l'ARFP mut8 Δ 11 a été évalué. La ligne rouge pointillée représente le seuil de positivité de 50 SFC/million PBMCs, tel que décrit dans la section « Matériel et méthodes ».

3.1.3 Création de lignées cellulaires et isolation de clones spécifiques contre l'ARFP mut8 Δ 11

Comme 3^e objection, afin de déterminer le/les épitope(s) reconnu(s) sur la protéine ARFP mut8 Δ 11, les PBMCs du patient 4545-HABT furent utilisées dans la création de lignées cellulaires spécifiques. Afin d'enrichir la population de lymphocytes T spécifiques, 2 stimulations avec la protéine recombinante en présence de PBMCs autologues en utilisant un ratio 1:2 (lignée cellulaire : PBMCs autologues) ont été faites. La spécificité fut vérifiée

par cytométrie en flux *via* un marquage de l'interféron- γ après stimulation des cellules (résultats non montrés). À ce moment, nous avons constaté que les lymphocytes de la lignée cellulaires qui étaient spécifiques contre l'ARFP étaient du phénotype CD3+, CD4+ et CD8-. Après avoir procédé à une purification par sélection négative des lymphocytes CD3+, CD4-, CD8+ à l'aide de billes magnétiques anti-CD8, nous avons ensuite procédé au sous-clonage de la lignée cellulaire.

Un total de 486 clones fut criblé *via* l'essai de prolifération cellulaire à la thymidine ^3H . Brièvement, dans des plaques de 96 puits, 5 cellules/puits de la ligné furent mises en présence de 50 000 BLCLs autologues irradiés/puits et préchargés avec la protéine ARFP mut8 Δ 11. Après une incubation de 48 heures, 1 μCi de thymidine ^3H /puits fut ajouté et une autre incubation, cette fois-ci de 18 heures, eut lieu. Après récolte des cellules sur membrane de fibre de verre, les meilleurs clones obtenus répondant aux critères, i.e. compte de radioactivité supérieur à 4 000 CPM, indice de stimulation égal ou supérieur à 3, furent amplifiés en culture cellulaire par des stimulations non spécifiques avec anticorps anti-CD3 humain (0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$), des PBMCs non-autologues irradiés (ratio 1 :2, clones : PBMCs) et avec de l'IL-2 (40 IU/mL). Ceux ayant démontré une bonne croissance cellulaire lors des stimulations *in vitro* non spécifiques; furent testés par cytométrie en flux en faisant un marquage à l'interféron- γ après stimulation ou non avec l'ARFP mut8 Δ 11 (figure 11). Les clones 2 et 5 ayant démontré les meilleures productions d'interféron- γ après stimulation, respectivement 72,0 et 66,4% (figure 11), ils furent choisis pour déterminer la séquence en acides aminés de l'épitope reconnu et la restriction par le CMH II.

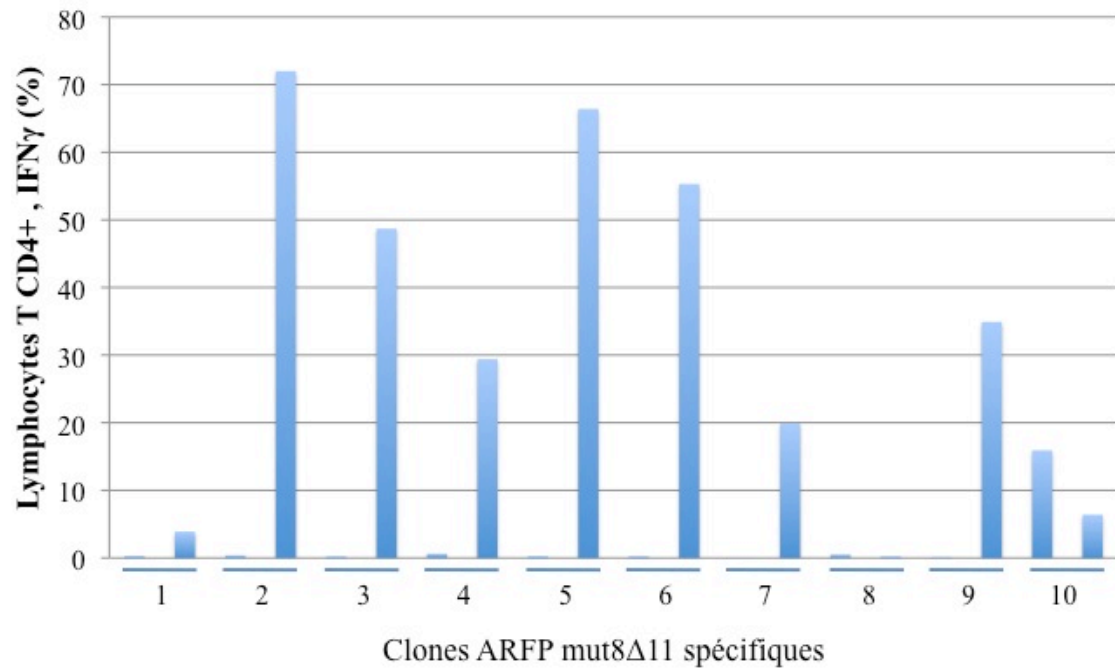


Figure 11 : Détection de l'IFN- γ des clones T, CD4+ ARFP mut8 Δ 11 spécifiques dérivés du patient 4545-HABT.

Des analyses des clones T CD4+ ARFP mut8 Δ 11 spécifiques stimulés ou non *in vitro* (No 1 à 10) ont été faites après marquage intracellulaire de l'IFN- γ et acquisition des résultats par cytométrie en flux tel que décrit dans matériel et méthodes. Pour chaque clone, la première colonne correspond aux cellules non stimulées, alors que la deuxième correspond aux cellules stimulées.

3.1.4 Détermination de la séquence de l'épitope et de la molécule du CHM II impliquée dans la présentation antigénique

Afin de déterminer la séquence de l'épitope ciblé par les clones 2 et 5, nous avons d'abord testé 2 groupes de peptides couvrant la totalité de la séquence de l'ARFP. Le premier correspondant au génotype 1a, isolat H77 et l'autre étant basé sur une séquence consensus de tous les génotypes du VHC (voir matériel et méthodes). Des marquages de l'interféron- γ , après stimulation des clones, furent analysés par cytométrie en flux. Pour les 2 clones l'ARFP mut8 Δ 11 spécifiques (2 et 5), aucune réponse ne fut induite avec les 2 groupes de peptides. Cependant, les clones ont très bien répondu lorsque stimulés avec la protéine l'ARFP mut8 Δ 11. Des valeurs d'interféron- γ de 56,5 et 35,1 % pour les clones 2 et 5 respectivement furent obtenues (figure 12).

À l'aide de la technique de cytométrie en flux, nous avons alors procédé à l'essai de restriction afin de déterminer quelle molécule du CMH II était impliquée dans la reconnaissance de l'ARFP mut8 Δ 11. Pour les 2 clones, en utilisant des anticorps anti-DR ou DP et DQ, nous avons démontré que la molécule DR était celle qui était impliquée (figure 13).

Cependant, comme les clones 2 et 5 n'ont pas répondu aux peptides de l'ARFP dont nous disposons (pool 1a, H77 et pool séquence consensus), nous n'avons pas été en mesure de déterminer la/les séquence(s) exacte(s) de l'ARFP ciblée(s) par la réponse immunitaire cellulaire.

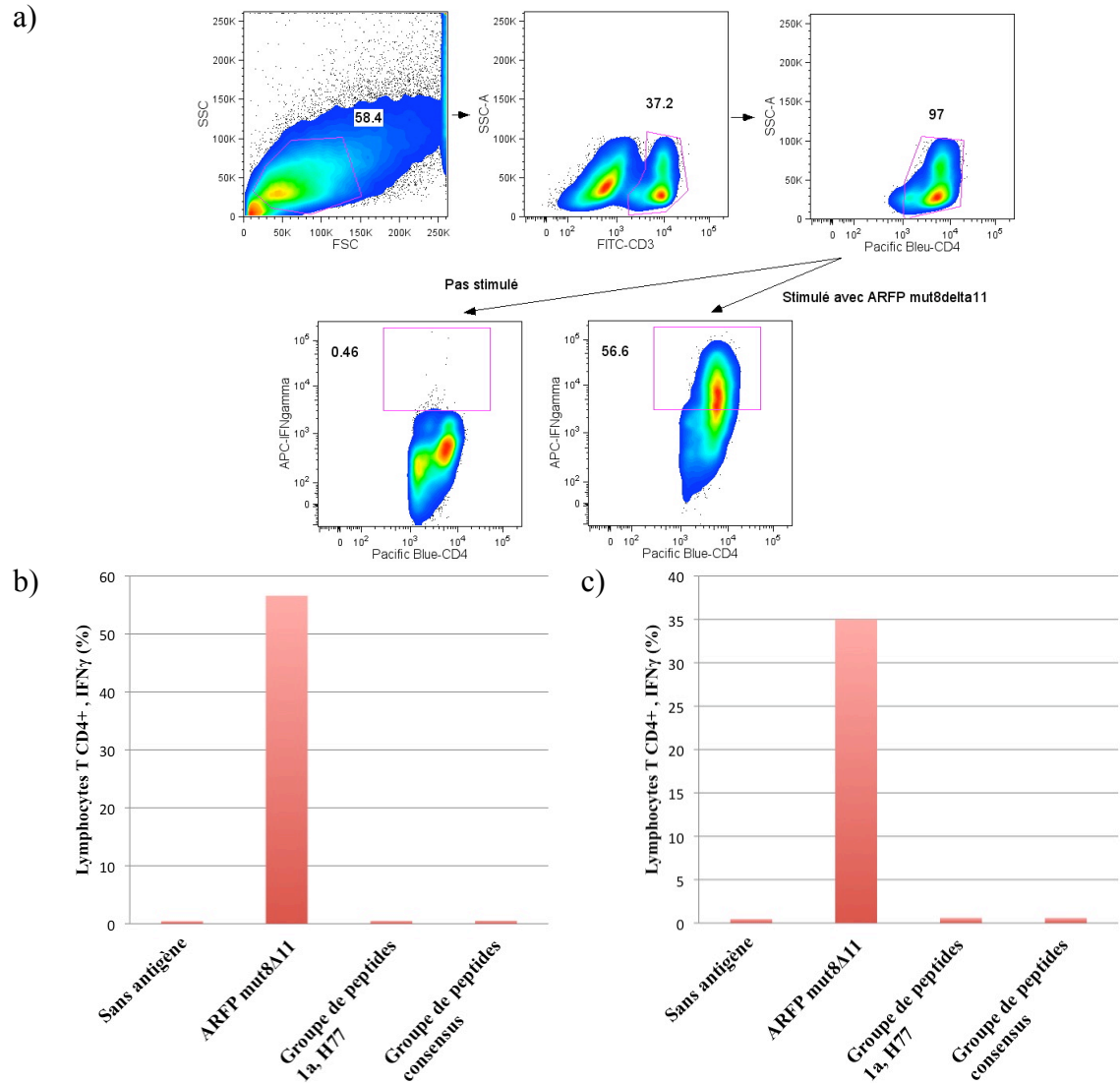


Figure 12 Production d'IFN γ par les clones T CD4⁺ 2 et 5, dérivés du patient 4545-HABT, en réponse à l'ARFP mut8 Δ 11, aux groupes de peptides 1a, H77 et consensus.

Marquage intracellulaire de l'IFN- γ et acquisition des résultats par cytométrie en flux tel que décrit dans matériel et méthodes. En a) un exemple de la stratégie de sélection des populations cellulaires. Il s'agit du clone 2 stimulé ou non avec l'ARFP mut8 Δ 11, donnant des pourcentages respectifs d'IFN- γ de 0,46 et 56,6%. En b) et c) il s'agit du clone 2 et 5 respectivement.

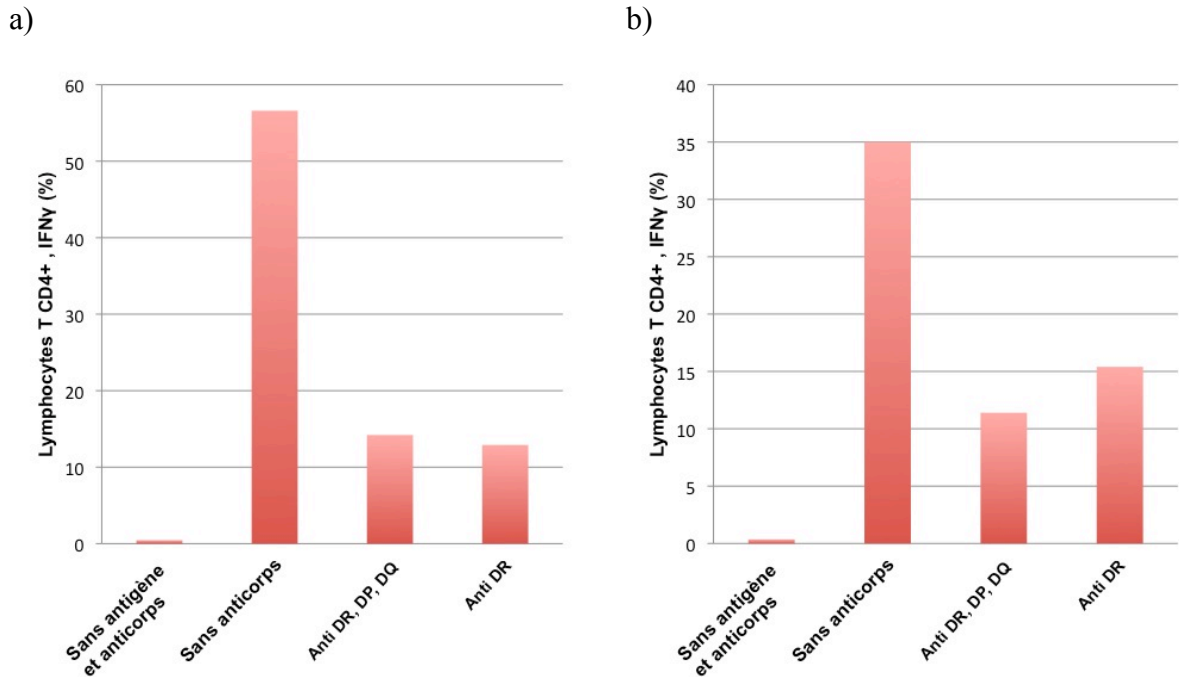


Figure 13 : Production d'IFN- γ après stimulation des clones T CD4+, no 2 et 5 avec l'ARFP mut δ 11 en présence ou en absence des anticorps anti-MHC II.

La restriction en a) du clone 2 et en b) du clone 5 fut déterminée en mesurant le pourcentage d'inhibition de la production d'IFN- γ après stimulation *in vitro* avec l'ARFP mut δ 11 en présence ou en absence des anticorps anti-MHC II tel que décrit dans matériel et méthodes.

3.2 Cartographie haute résolution des épitopes retrouvés lors de l'infection au VHC génotype 3a

Notre cohorte est composée en majorité de patients infectés avec le génotype 3a du virus du VHC. Peu d'épitopes ont été identifiés chez celui-ci, comparativement au génotype 1a. Comme premier criblage, nous avons testé le patient 4757-HAJX qui a résolu l'infection au VHC de génotype 3a. Ce dernier sera l'objet des résultats décrits ci-dessous. Ultiment, d'autres patients infectés ayant guéri spontanément ou ayant une infection chronique seront aussi testés afin de continuer l'étude. Les objectifs à long terme sont de :

- ↳ Cartographier les épitopes reconnus chez les patients infectés au génotype 3a.
- ↳ Comparer les patients entre eux afin de trouver des épitopes dominants.
- ↳ Comparer avec les patients infectés par le génotype 1a afin de déterminer l'importance des différences.

3.2.1 Criblage de la réponse immunitaire

Afin de déterminer la spécificité et l'étendue de la réponse immunitaire cellulaire contre la polyprotéine du VHC, nous avons utilisé l'ELISpot IFN- γ . Les PBMCs du patient 4757-HAJX furent évaluées (Figure 15). Un résultat positif, supérieur à 50 SFC/million PBMCs, fut détecté pour les antigènes suivants: core, E1, NS3, NS4a/b, NS5a et NS5b. La plus haute fréquence antigénique, 193 SCF/million PBMC, fut obtenue contre la protéine NS3. Pour les protéines P7, NS2 et l'ARFP, la fréquence des PBMCs spécifiques étant sous notre seuil de positivité de 50 SFC/million PBMCs, le résultat fut considéré négatif.

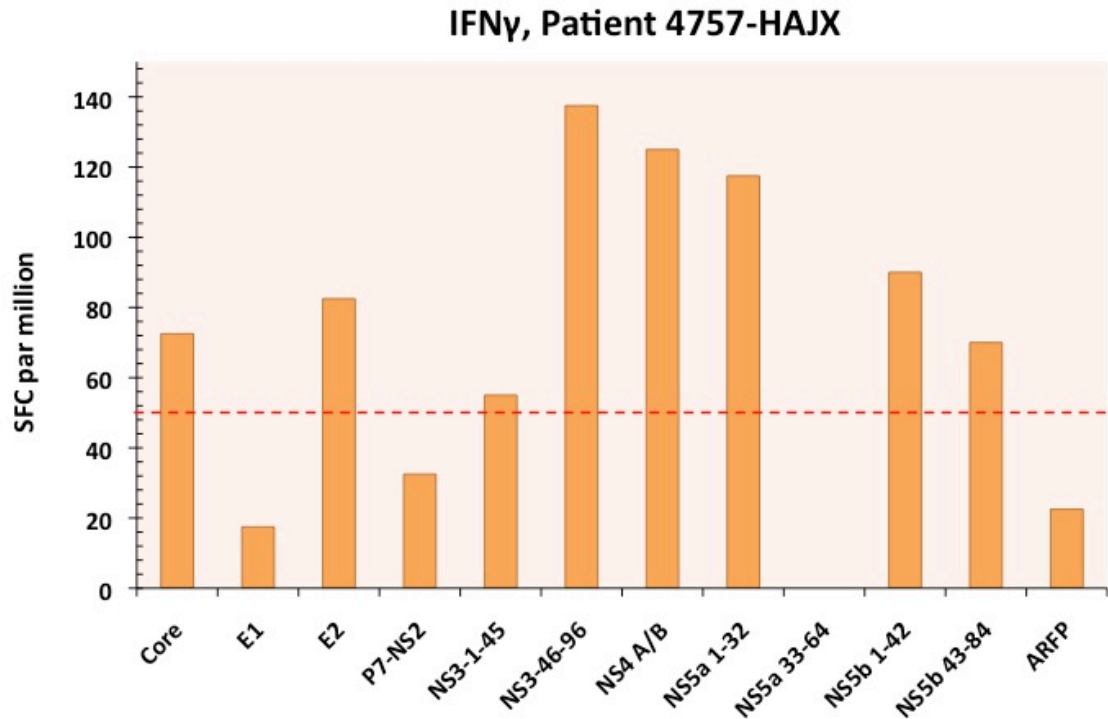


Figure 15 : Détection de la production d'IFN- γ par les cellules spécifiques aux différentes protéines du VHC, chez le patient 4757-HAJX infecté au génotype 3a.

Les antigènes utilisés sont des peptides de 12-18 mers se chevauchant par 11-12 acides aminés couvrant la totalité de la polyprotéine du virus de l'hépatite C. Ils furent regroupés pour correspondre à : core, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4a/b, NS5a, NS5b et l'ARFP. Notez que les peptides couvrant les protéines P7 et NS2 furent regroupés et que ceux couvrant les protéines NS3, NS5a et NS5b furent divisés en 2 groupes.

3.2.2 Génération de lignées lymphocytaires et isolation de clones spécifiques des antigènes du VHC

Afin de cartographier la réponse immunitaire et déterminer la spécificité au niveau des épitopes, les PBMCs du patient 4757-HAJX furent utilisés pour générer des lignées cellulaires contre chacun des groupes de peptides (voir matériels et méthodes) ayant démontré un résultat positif par ELISpot. Par la technique de cytométrie en flux, nous avons déterminé le phénotype des cellules spécifiques sécrétant de l'IFN- γ à l'aide d'un marquage de surface et intracellulaire. Nous avons déterminé l'origine lymphocytaire (CD3+) et CD4 (CD4+, CD3+) ou CD8 (CD8+, CD4-,CD3+) (résultats non montrés). Ainsi, nous avons constaté que tous les lymphocytes de la lignée cellulaire qui étaient spécifiques étaient du phénotype CD3+, CD4+ et CD8-. Après avoir procédé par sélection négative des lymphocytes T CD8+ à l'aide de billes magnétiques contenant des anticorps anti-CD8, nous avons procédé au sous-clonage des lignées cellulaires CD3+, CD4+, CD8-. Chaque clone T CD4+ fut alors testé en utilisant l'essai de prolifération cellulaire à la thymidine ^3H .

Dans des plaques de 96 puits, 5 clones T CD4+/puits furent mis en présence de BLCLs autologues irradiées préstimulées ou non avec les groupes de peptides (antigènes). Un total de 486 clones/antigène fut criblé pour un grand total de 2880 clones. La qualité des clones fut déterminée par un compte de radioactivité supérieur à 4 000 CPM et un indice de stimulation égal ou supérieur à 3. Les clones correspondant à ces critères sont énumérés dans tableau V. Afin d'amplifier les clones, une stimulation non spécifique avec un anticorps anti-CD3 humain (0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de l'IL-2 (20 IU/mL) et 2×10^6 PBMCs non-autologues irradiées/ 1×10^6 clones furent utilisés. Enfin, ceux ayant une bonne croissance cellulaire lors de ces stimulations non spécifiques *in vitro*, 3-4-F10, 5-1-G9, 7-4-H12, 8-3-B1 et 10-3-C4 respectivement spécifiques contre E2, NS3, NS4a/b, NS5a et NS5b, furent choisis pour la caractérisation (voir tableau V, clones soulignés en couleur).

Clones ID	Spécificité	Compte (CPM)	Indice de stimulation	Clones ID	Spécificité	Compte (CPM)	Indice de stimulation
1-1-C1	Core	14802	7,46	7-3-C11	NS4a/b	11977	9,32
1-3-D11	Core	11259	12,35	7-4-F6	NS4a/b	14939	14,53
1-3-H12	Core	10089	15,86	7-1-A3	NS4a/b	14243	7,30
1-5-C8	Core	11293	19,88	<u>7-4-H12</u>	<u>NS4a/b</u>	<u>14038</u>	<u>17,26</u>
1-5-A12	Core	6892	3,36	7-5-D1	NS4a/b	15979	9,23
1-2-B2	Core	4699	6,67	7-5-A11	NS4a/b	11166	7,89
1-3-B4	Core	10490	7,39	8-1-D5	NS5a	22639	6,58
1-4-B7	Core	12417	14,52	8-2-F4	NS5a	26784	5,08
3-1-E3	E2	13322	12,70	<u>8-3-B1</u>	<u>NS5a</u>	<u>22372</u>	<u>8,24</u>
3-2-H10	E2	13234	12,92	8-3-C3	NS5a	12664	4,10
<u>3-4-F10</u>	<u>E2</u>	<u>11600</u>	<u>4,96</u>	8-3-H5	NS5a	47835	8,08
3-4-E2	E2	16601	4,4	8-3-B7	NS5a	27182	4,46
3-5-H6	E2	13868	11,11	8-3-F10	NS5a	12016	3,24
3-1-F8	E2	14357	8,02	10-1-G1	NS5b	111359	5,01
3-2-A9	E2	11288	3,71	10-1-A5	NS5b	37262	4,68
3-2-E12	E2	17408	8,15	10-2-D4	NS5b	28286	7,25
3-4-H5	E2	11510	3,73	10-2-D5	NS5b	62701	9,40
<u>5-1-G9</u>	<u>NS3</u>	<u>9080</u>	<u>12,09</u>	10-2-E5	NS5b	66705	10,08
5-2-A11	NS3	8105	11,83	10-2-E6	NS5b	89471	11,82
5-3-F2	NS3	10676	15,51	10-3-G1	NS5b	92901	13,08
5-5-F11	NS3	20645	10,04	<u>10-3-C4</u>	<u>NS5b</u>	<u>213071</u>	<u>33,81</u>
5-5-G11	NS3	10336	10,24	10-3-D7	NS5b	28144	4,26
5-3-E10	NS3	7164	3,81	10-3-A8	NS5b	128273	21,60
5-5-A8	NS3	15193	7,28	10-3-B9	NS5b	40817	9,53
7-1-G2	NS4a/b	10574	10,67	10-3-E12	NS5b	149171	26,92
7-1-G8	NS4a/b	11761	16,85	10-4-A5	NS5b	97875	14,71
7-2-D4	NS4a/b	10827	7,35	10-4-H6	NS5b	44352	6,7

Tableau V : Résultats de l'essai de prolifération à la thymidine 3H

3.2.3 Cartographie des épitopes reconnus par les clones T CD4+

Pour déterminer les épitopes ciblés par les clones T CD4+, nous avons testé individuellement par ELISpot anti-IFN γ chaque peptide qui faisait initialement partie des groupes de peptides contre lesquels les clones réagissaient. Les résultats compilés des ELISpots démontrent les épitopes reconnus par les clones en rapport avec la séquence la polyprotéine du VHC (figure 16) ainsi que leurs séquences peptidiques (tableau VI, génotype 3a, K3/650). Tous les clones ne reconnaissent qu'un seul peptide à l'exception des clones 7-4-F10 et 8-4-B1 qui reconnaissent 2 peptides adjacents dont la séquence commune est soulignée dans le tableau VI. En effet, les séquences peptidiques se chevauchant par 11 à 12 acides aminés expliquent la reconnaissance de 2 peptides par un même clone.

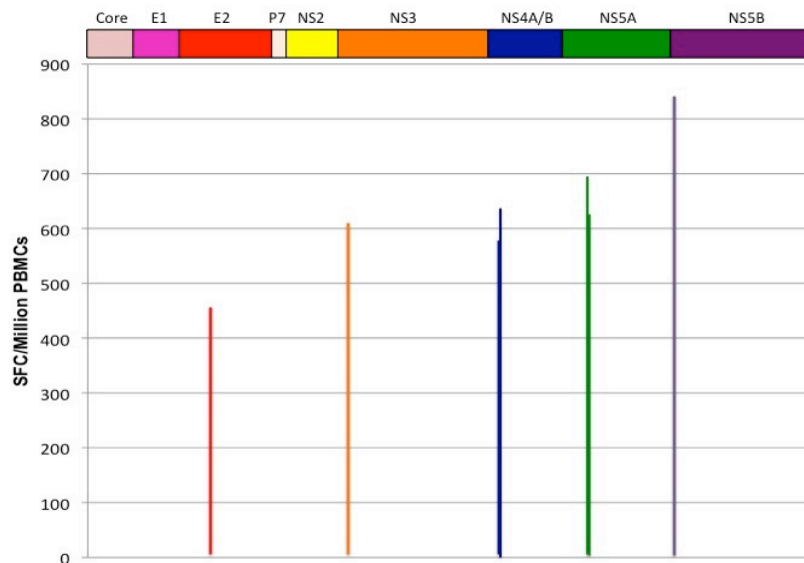


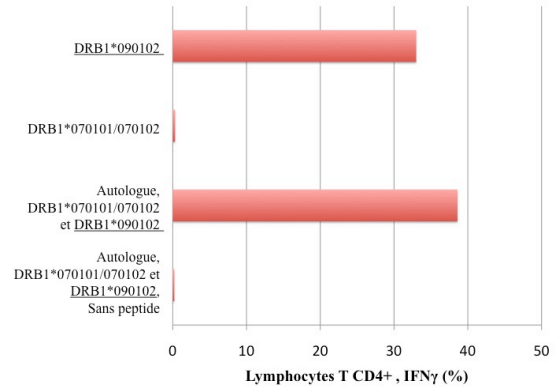
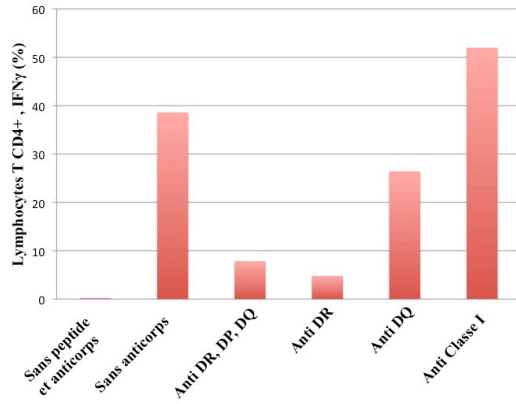
Figure 16 : Analyse par ELISpot anti-IFN γ des épitopes reconnus par les clones T CD4+ isolés chez le patient 4757-HAJX.

Les résultats pour chaque clone furent alignés à l'endroit correspondant à l'épitope reconnu sur la polyprotéine du VHC. Clone 3-4-F10 (rouge), 5-1-G9 (orange), 7-4-F10 (bleu), 8-3-B1 (vert) et 10-3-C4 (violet).

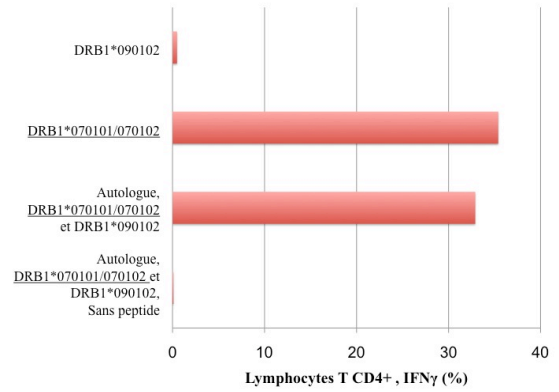
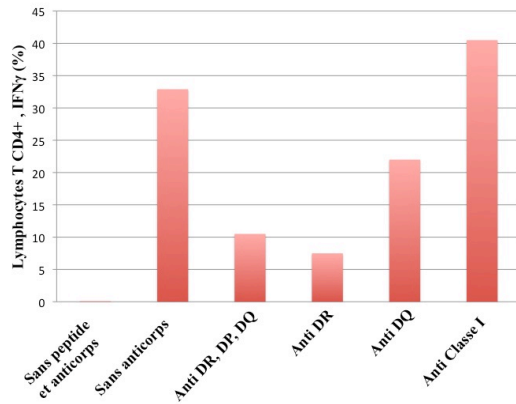
3.2.4 Caractérisation de la restriction du CMH II et des allèles impliqués dans la présentation des épitopes

Afin de déterminer la restriction des CMH II impliquée lors de la stimulation des clones T CD4+, la technique de cytométrie en flux fut utilisée. Dans la présentation antigénique du CMH II, diverses molécules peuvent être impliquées : DR, DP et DQ. Afin de connaître la molécule du CMH impliquée (restriction), chaque clone fut testé en présence ou non d'anticorps spécifiques contre les molécules du CMH II: anti-DR, DP, DQ, anti-DQ, anti-DR et anti-classe I (contrôle négatif). Selon leurs spécificités, ceux-ci ont permis de bloquer ou non la production d'interféron- γ induite par la stimulation peptidique selon l'implication ou non de la molécule du CMH II ciblée. Ce test a permis de constater que tous les clones T CD4+ étant restreints par la molécule DR du CMH II (figure 17). Pour la molécule DR, le patient 4757-HAJX exprimant les allèles DRB1*070101/070102 et DRB1*090102. En utilisant l'essai de semi-correspondance des BLCLs, nous avons déterminé lequel des allèles de la molécule DR était impliqué dans la reconnaissance de chacun des épitopes. Ce test consiste à stimuler, en présence de peptides, les différents clones au moyen de cellules présentatrices d'antigènes, dans le cas présent des BLCLs. Des BLCLs autologues et non-autologues, mais comportant au moins un des allèles présents chez le patient 4757-HAJX furent utilisés. C'est seulement dans les cas où l'allèle reconnu par le clone est impliqué dans la présentation qu'il y a induction de la stimulation et production d'interféron- γ . L'allèle impliqué dans la reconnaissance des épitopes était DRB1*070101/070102 pour tous les clones, à l'exception du clone 3-4-F10 pour lequel c'était l'allèle DRB1*090102 (figure 17 et tableau VI).

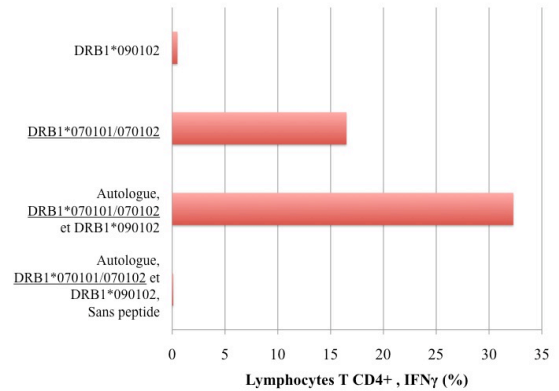
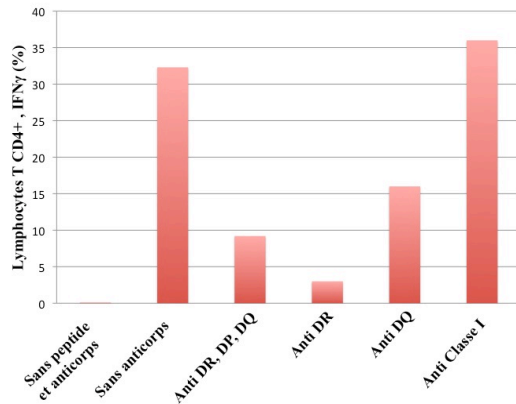
a) **3-4-F10 : E2₅₀₄₋₅₂₁, DRB1*090102**



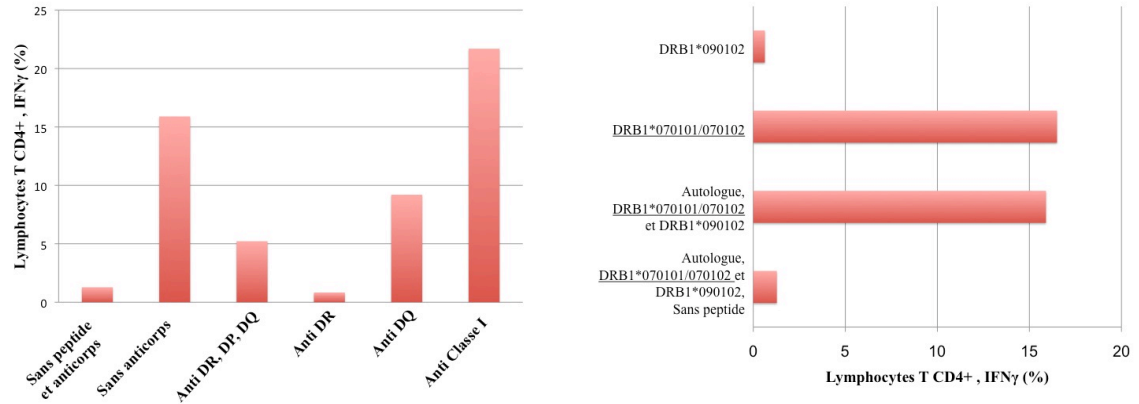
b) **5-1-G9 : NS3₁₀₆₄₋₁₀₈₁, DRB1*070101/070102**



c) **7-4-H12 : NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, DRB1*070101/070102**



d) **8-3-B1 : NS5a₂₀₇₄₋₂₀₉₁, DRB1*070101/070102**



e) **10-3-C4 : NS5b₂₄₂₁₋₂₄₃₆, DRB1*070101/070102**

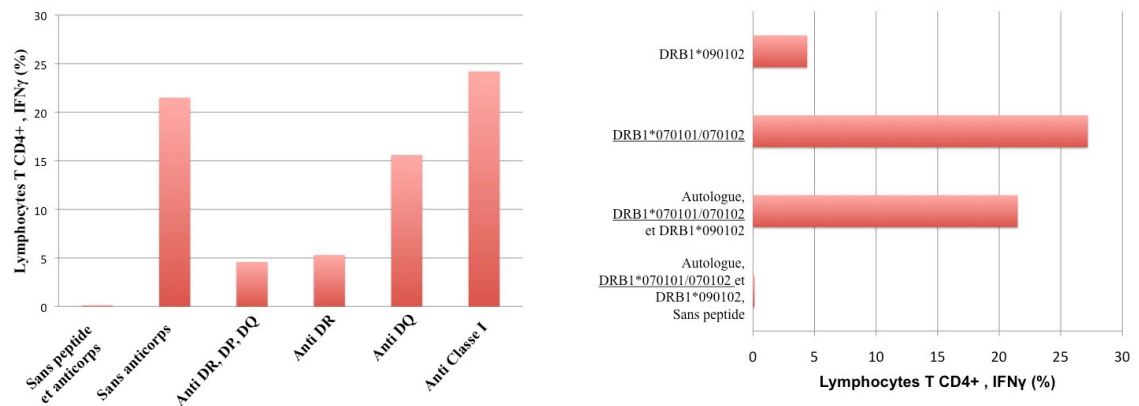


Figure 17 : Détermination de la restriction et de l'allèle du CMH II impliqué pour chaque clone T CD4+ isolés chez le patient 4757-HAJX.

Dans le premier graphique, pour chaque clone a) 3-4-F10 b) 5-1-G9 c) 7-4-H12 d) 8-3-B1 e) 10-3-C4, la restriction par la molécule du CMH II impliquée dans la présentation fut déterminée après stimulation *in vitro* en présence ou en absence des anticorps anti-CMH II ou anti-CMH I (contrôle) tel que décrit dans matériel et méthodes. Dans le deuxième graphique, l'allèle de la molécule DR impliqué dans la présentation a été déterminé : DRB1*070101/070102 ou DRB1*090102.

Clones ID	Spécificité protéine/n°a.a.	Génotype	Identité entre génotypes (%)	Allèle HLA-DR	
3-4-F10	E2 ₅₀₄₋₅₂₁	3a (K3)	GPVYC F TPSPVVVGTTDA	(94,4)	DRB1*090102
		1a (H77)	GPVYC F TPSPVVVGTT D R		
		3a (K3)	TATQ T FLLG T VG-GVMWTV		
5-1-G9	NS3 ₁₀₆₄₋₁₀₈₁	1a (H77)	TATQ T FLL G VG-GVMWTV	(68,4)	DRB1*070101/070102
		3a (K3)	TATQ T FLL G VG-GVMWTV		
7-4-H12	NS4b ₁₇₅₉₋₁₇₇₆	3a (K3)	VLWHKHMWNFVSGIQ Y LA	(83,3)	DRB1*070101/070102
		1a (H77)	V F WAKHMWNF I SGIQYLA		
	3a (K3)	W N FVSGIQ Y LAGL S TL			
	NS4b ₁₇₆₆₋₁₇₈₁	1a (H77)	W N F I SGIQ Y LAGL S TL		
8-3-B1	NS5a ₂₀₇₄₋₂₀₉₁	3a (K3)	PPNY T RALWRVAANSYV	(66,7)	DRB1*070101/070102
		1a (H77)	PPNY K FALWRV S A E EYV		
		3a (K3)	A LWRVAANSY V E V RRV		
10-3-C4	NS5b ₂₄₂₁₋₂₄₃₆	3a (K3)	SMSYSWTGAL I TP C SA	(87,5)	DRB1*070101/070102
		1a (H77)	SMSYSWTGAL V TP C AA		

Tableau VI : Pourcentage de conservation des épitopes entre les génotypes 3a et 1a; et allèles HLA-DR impliqués pour chaque clones isolés à partir du patient 4757-HAJX.

*Référence de la séquence du génotype 3a, K3/650 : NCBI, BAA06040

**Référence de la séquence du génotype 1a, H77 : NCBI, AAB67036-38

***Ce tableau fût généré en utilisant le « HCV Sequence Locator Tool »:

<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html>

3.2.5 Analyse du niveau de conservation des épitopes entre le génotype 1a et 3a

La plupart des connaissances sur l'hépatite C concernent le génotype 1a, car c'est le génotype qui prédomine dans les infections en Amérique du Nord et en Europe. Nous avons réalisé des alignements avec la séquence de référence H77 (du génotype 1a) afin de comparer le niveau d'identité des épitopes avec le génotype 3a. Le niveau de conservation se situe entre 66,7 à 94,4% (tableau VI). Une recherche sur le site de la « HCV database » (<http://hcv.lanl.gov/>) a permis de découvrir qu'il s'agit de nouveaux épitopes qui étaient inconnus jusqu'à ce jour, à l'exception de l'épitope NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, un épitope immunodominant précédemment décrit par le groupe de Gerlach J.T. et al (2005).

CHAPITRE 4. Discussion

4.1 Sommaire des résultats

Il est impératif de travailler à avoir une meilleure compréhension de la pathogenèse du VHC afin qu'on puisse mettre des traitements plus efficaces et moins handicapants. On se doit également de travailler au développement d'un vaccin afin de prévenir/guérir cette infection souvent mortelle. Une des approches contribuant à une meilleure compréhension de la pathogenèse du VHC et à l'élaboration de stratégies de vaccination est la caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire induite par le virus, l'identification d'épitopes immunodominants, et des déterminants de la réponse initiale.

Dans mon projet de maîtrise, nous avons d'abord voulu caractériser la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP. Tout d'abord, nous avons voulu déterminer longitudinalement la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP pendant la phase aigüe de l'infection et la comparer avec celle des protéines core et NS3. En utilisant des peptides couvrant toute la séquence des antigènes, nous n'avons pu détecter de réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP lors de la phase aigüe, contrairement à ce qui a été obtenu pour les protéines core et NS3 et ce, autant pour les patients qui ont résolu l'infection spontanément que pour ceux où l'infection a persisté. En utilisant comme antigène une forme recombinante de l'ARFP ne comportant pas les 11 premiers acides aminés de core (ARFP mut8Δ11), nous avons réussi à détecter une réponse cellulaire positive sur un total de 11 patients testés. Cependant, les essais de caractérisation de cet épitope ont suggéré que la réponse était non spécifique et dirigée contre autre chose que l'ARFP. Deuxièmement, nous avons voulu caractériser la réponse contre l'ARFP retrouvée chez ce patient en déterminant le phénotype des lymphocytes T spécifiques contre l'ARFP ainsi que l'épitope ciblé. Il ne fut pas possible de déterminer la séquence exacte de l'épitope, les peptides dont nous disposions n'ont pas permis aux clones T CD4 spécifiques contre l'ARFP mut8Δ11 (#2 et #5), de réagir lors de la stimulation. Cependant, nous avons démontré que les lymphocytes répondant spécifiquement étaient du phénotype CD3+, CD4+, CD8- et que la molécule du CMH II impliquée dans la reconnaissance était DR. Enfin, nous voulions voir

si une corrélation existait entre la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP et la résolution de l'infection. Ces résultats suggèrent fortement que la réponse immunitaire contre l'ARFP n'est pas importante pour la guérison du VHC chez l'humain, puisque la réponse immunitaire lors de la phase aiguë de l'infection était indétectable.

Dans un deuxième volet, nous avons pensé qu'il serait intéressant de caractériser la réponse immunitaire cellulaire chez un des patients infectés au génotype 3a. Comme les patients de notre cohorte sont majoritairement infectés par ce génotype et que peu d'épitopes furent auparavant identifiés chez celui-ci, nous avons voulu dans un premier objectif commencer la cartographie et déterminer les épitopes ciblés spécifiquement par les lymphocytes T chez un patient infecté au génotype 3a. Nous avons identifié 5 épitopes spécifiquement reconnus par des lymphocytes T de phénotypes CD3+, CD4+ et CD8- : E2₅₀₄₋₅₂₁, NS3₁₀₆₄₋₁₀₈₁, NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, NS5a₂₀₇₄₋₂₀₉₁, NS5b₂₄₂₁₋₂₄₃₆. Ensuite, nous avons voulu caractériser la réponse immunitaire cellulaire ciblant ces épitopes. À partir de clones T isolés chez le patient 4757-HAJX, nous avons déterminé que la molécule du CMH II impliquée était DR et que les allèles impliqués étaient : DRB1*090102 pour l'épitope E2₅₀₄₋₅₂₁, alors que pour tous les autres c'était DRB1*070101/070102. Finalement, nous avons cherché à savoir à quel point les épitopes retrouvés chez un patient infecté avec le génotype 3a se comparaient avec ceux connus pour le génotype 1a. Après avoir fait des analyses de séquences avec les épitopes connus sur la banque de données du VHC (<http://hcv.lanl.gov/content/immuno/immuno-main.html>), nous avons constaté que 4 épitopes sur 5 ne correspondaient à aucun épitope connu. Enfin, nous avons constaté que l'épitope NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, identifié auparavant (Gerlach, J.T. et al, 2005), est immunodominant et conservé entre génotypes, ce qui suggère qu'il pourrait être un candidat intéressant pour la mise au point d'un vaccin à base de peptides immunogéniques contre le VHC.

4.2 La réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP lors de la phase aigüe de l'infection au VHC

4.2.1 L'ARFP n'est pas immunogénique, ni immunodominante, ni importante dans la résolution de l'infection au VHC lors de la phase aigüe.

Après avoir testé, à l'aide de la technique de l'ELISpot anti-IFN- γ , des échantillons longitudinaux de PBMCs de patients infectés par différents génotypes, avant infection, pendant la phase aigüe (1 et 3 mois après infection) et jusqu'à 6 mois d'infection au VHC (après guérison spontanée ou établissement de la persistance), nous n'avons pas détecté de réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP. Ceci vaut autant pour les patients ayant résolu spontanément l'infection que pour ceux ayant développé une infection persistante, peu importe le temps d'infection, dans la phase aigüe de l'infection (au premier et troisième mois), ou après guérison ou développement de la persistance (après 6 mois). Par contre, 2 études faites précédemment ont démontré la présence de réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP. D'abord, l'étude de Bain C. et al (2004) a permis de démontrer la présence de réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP. En utilisant un peptide de 99 a.a. (G97A), ils ont démontré, à l'aide de la technique de l'ELISpot anti-IFN- γ ou anti-IL-10 que 6 patients sur 47 (13%) testaient positifs. En ne tenant compte que de l'ELISpot anti-IFN- γ , la technique que nous avons utilisée, le pourcentage de patients ayant une réponse contre l'ARFP est de 4%. La 2e étude a démontré la présence de précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques contre l'ARFP. Elle a été faite sur 11 patients infectés au VHC et 9 co-infecté au VIH (un total de 20) et a démontré respectivement une fréquence de 81.8% et 77.8% de lymphocytes T précurseurs de CTL (Troesch, M. et al, 2005). Ces 2 études présentent un très grand écart de la fréquence des réponses immunitaires cellulaires contre l'ARFP. La différence des résultats s'explique

probablement par les techniques utilisées qui étaient différentes, respectivement l'ELISpot et l'essai de cytotoxicité des lymphocytes faite à partir de dilution limitante.

Notre étude, faite lors de la phase aigüe de l'infection, se rapproche plutôt des résultats obtenus par l'étude de Bain C. et al (2004) qui rapporte une faible fréquence de la prédominance de la réponse immunitaire contre l'ARFP, 4%, chez des patients ayant une infection persistante. Cependant, nous n'avons détecté aucune réponse immunitaire cellulaire. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'ARFP est instable et se dégrade rapidement et que la réponse immunitaire cellulaire générée est très faible, sous notre seuil de positivité (Wolf, M. et al, 2008; Yuksek, K. et al, 2009) . Nous croyons aussi que cela pourrait être dû aux réactifs utilisés et dans la façon dont les ELISpots furent réalisés. Nous avons utilisé des peptides de 12-18 mers se chevauchant par 10-12 acides aminés couvrant toute la protéine l'ARFP (150 a.a.) regroupés et mis directement dans la plaque à ELISpot contenant 200 000 PBMCs/puits, puis incubé pendant 36 hrs. Bain et al ont utilisé un peptide de 99 a.a. couvrant partiellement de l'ARFP, à conc. de 1µg/mL avec un nombre de cellules inconnu (non mentionné dans l'article) le tout étant préincubé dans des tubes pendant 16 hrs avant d'être transféré en plaque pendant 24 h. Il y a aussi les autres réactifs (sérum, milieu de culture), le manipulateur, le logiciel d'analyse qui ont pu influencer. De plus, il est important de mentionner qu'une partie de la réponse a pu être manquée. Comme toutes les études s'apparentant à la nôtre, il est impossible de générer des peptides autologues pour chaque patient, pour des raisons pratiques et de coûts. Idéalement, pour optimiser la détection de la réponse immunitaire cellulaire, on devrait tenir compte de la séquence autologue du virus causant l'infection, ainsi que du typage d'antigène des leucocytes humains (HLA) du patient infecté. Pour l'instant, ces limitations ne peuvent être surmontées. Il faut aussi mentionner que nous avons utilisé des peptides synthétisés correspondants aux épitopes décrits par Bain et al (2004) et d'autres généreusement fournis par Dr Soudeyns, correspondant aux épitopes putatifs décrits par Troesch et al (2005) afin de détecter la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP chez 4 patients donc le typage

HLA correspondait aux épitopes décrits (résultats non montrés). Nous n'avons pas pu détecter de réponse positive.

Par contre, la force de notre étude résidait dans le fait que la réponse immunitaire contre l'ARFP durant la phase aigüe n'avait jamais été évaluée. Ceci est important, car les études précédentes portant sur l'ARFP (Bain, C. et al, 2004; Troesch, M. et al, 2005) ont utilisé en majorité des échantillons de patients ayant une infection chronique (plus de 6 mois après infection). On sait que chez ces patients qui ne réussissent pas à contrôler et éliminer l'infection, la réponse immunitaire cellulaire décline après avoir atteint son maximum dans la phase aigüe (6 premiers mois de l'infection). Même que chez certains patients ayant une infection chronique au VHC, il arrive qu'on ne détecte aucune réponse immunitaire cellulaire (Gerlach, J.T. et al, 1999). D'où l'intérêt que nous avons de faire les tests durant la phase aigüe, au moment où la réponse atteint son maximum et les chances de détecter la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP sont optimales.

Bien que nous n'ayons rien détecté pour l'ARFP, nous avons détecté des réponses immunitaires cellulaires contre NS3 et core, autant pour les infections ayant été résolues que pour les infections persistantes. Pour les patients ayant résolu l'infection, on remarque que les médianes pour NS3 à tous les temps d'infection sont plus élevées lorsque comparées avec celles des patients ayant une infection persistante. Ces observations confirment ce qui avait été observé auparavant, la réponse contre NS3 est plus forte lors de la guérison spontanée (Diepolder, H.M. et al, 1995 et 1997; Day, C.L. et al, 2002; Lauer, G.M. et al, 2004 et 2005; Smyk-Pearson, S. et al, 2006). De plus, on observe que lors de la résolution spontanée, 50% ou plus des patients démontrent une réponse positive contre NS3 à tous les temps testés, contrairement à l'infection persistante où la réponse contre NS3 est observée chez moins de 30 % des patients, ce qui est aussi en accord avec les études ayant précédemment démontré que la réponse immunitaire cellulaire était plus vigoureuse lorsque l'hépatite C était éliminée (Gruner, NH et al, 2000; Thimme, R. et al 2001; Lechner, F et al. 2001; Shourky, N.H. et al, 2003). Pour la protéine core, les différences ne sont pas

évidentes entre les 2 groupes de patients, ce qui est normal puisqu'on sait que core contribue de 0 à 12% de la réponse cellulaire immunitaire selon les cas : infection persistante ou non, lymphocytes T CD8+ ou CD4+ (Smyk-Pearson, S. et al, 2006).

Dans une 2e tentative pour détecter la réponse immunitaire cellulaire contre l'ARFP, nous avons testé avec l'ARFPmut8Δ11 un autre groupe de 11 patients : 2 ayant guéri l'infection spontanément et 9 ayant une infection persistante (résultats non montrés). Nous avons détecté une réponse positive chez un seul patient sur 11. Nous avons détecté cette réponse positive à 3 temps de l'infection différents chez ce même patient (figure 10). À partir des PBMCs de ce patient, nous avons choisi 2 clones afin de caractériser cette réponse : #2 et #5. Des pourcentages de production d'IFN-γ de 72% et 67%, indiquant une bonne spécificité, furent respectivement obtenus. Nous avons pu démontrer que la réponse était restreinte par la molécule DR du CMH II. Comme nous n'avons pas pu déterminer les épitopes exacts étant ciblés, nous n'avons pas déterminé l'allèle impliqué. Il est possible que les épitopes recherchés étaient contenus dans la région N-terminal, qui contient 3 mutations que nous n'avons pu couvrir avec des peptides pour des raisons de coûts : L124S, L142P et K158R. Les épitopes pourraient aussi être dirigés contre le 6-his tag présent sur l'ARFPmut8Δ11 ou peut-être contre une protéine contaminante. Il se pourrait donc aussi que les clones 2 et 5 ne soient pas spécifiques contre l'ARFP.

En conclusion, nos résultats suggèrent fortement que la réponse contre l'ARFP n'est pas importante pour la résolution de l'infection contre le VHC puisque nous ne détectons pas de réponse immunitaire cellulaire lors de la phase aigüe. Par contre, en accord avec les études faites précédemment, nous avons démontré que la fréquence et la vigueur de la réponse contre NS3 étaient plus grandes chez les infections résolues spontanément que chez celles qui persistent. Enfin, pour la protéine core, il n'y a pas de différence notable. Celle-ci avait d'ailleurs été incluse dans le but de pouvoir s'assurer de la spécificité de la réponse immunitaire contre l'ARFP, étant donné qu'on sait que ces 2 protéines ont des acides aminés en communs.

4.3 Cartographie haute résolution des épitopes retrouvés lors de l'infection au VHC 3a

4.3.1 La réponse immunitaire cellulaire du patient 4757-HAJX est multispécifique

Afin de déterminer la spécificité et l'étendue de la réponse immunitaire cellulaire contre la polyprotéine du VHC, nous avons utilisé l'ELISpot anti-IFN- γ . La guérison de l'hépatite C est associée avec une réponse immunitaire cellulaire vigoureuse, multispécifique et dont l'activation est maintenue (Racanelli, 2003 ; Shoukry, 2004 ; Bowen, 2005 ; Rehermann, 2005). Initialement, nous avons testé un total de 8 patients infectés par le génotype 3a, et nous avons choisi de caractériser la réponse du patient 4757-HAJX, qui a résolu l'infection spontanément et qui a démontré la plus forte réponse immunitaire cellulaire. Nous constatons que la réponse de ce patient présente une de ces caractéristiques, la réponse immunitaire cellulaire est multispécifique et dirigée contre : core, E2, NS3, NS4a/b, et NS5. Pour le VHC de génotype 1, les antigènes NS3 et NS5 sont ceux qui contribuent le plus à la réponse immunitaire cellulaire (Diepolder, H.M. et al, 1995 et 1997; Day, C.L. et al, 2002; Lauer, G.M. et al, 2004 et 2005; Smyk-Pearson, S. et al, 2006). Dans notre cas, l'infection au génotype 3a, nos résultats sont similaires à ceux de cette étude, puisque lorsqu'on détermine le pourcentage de la réponse immunitaire cellulaire qui est dirigée contre NS3 et NS5, on obtient respectivement 25,7% et 37%; 62,7% de la réponse totale. Cependant, il s'agit que d'un patient, pour affirmer qu'on retrouve les mêmes proportions de la réponse cellulaire dirigée contre NS3 et NS5 pour le génotype 3, on devrait tester plus de patients infectés par ce génotype. Enfin, la réponse immunitaire cellulaire du patient 4757-HAJX est multispécifique et la majorité de la réponse est dirigée contre NS3 et NS5.

4.3.2 Les épitopes définis à partir du patient 4757-HAJX au VHC, génotype 3a, se retrouvent principalement dans les protéines non structurales (NS) du VHC

À partir des clones T CD4⁺ isolés, 3-4-F10, 5-1-G9, 7-4-H12, 8-3-B1 et 10-3-C4 respectivement spécifiques contre E2, NS3, NS4a/b, NS5a et NS5b, nous avons caractérisé 5 épitopes (tableau VI). Il est important de définir de nouveaux épitopes pour plusieurs raisons chez le génotype 3a : a) la majorité du travail fait concerne le génotype 1, b) ils sont le point de départ dans la mise au point de vaccins thérapeutiques/prophylactiques formulés de peptides immunogéniques, c) ils permettent la mise au point de nouveaux tétramères pour les CMH de classes I ou II, un outil important pour l'analyse et la compréhension de la réponse immunitaire et de la pathogenèse du VHC, d) ils permettent d'approfondir la compréhension de l'importance de la variabilité virale et des mécanismes de fuite de la réponse immunitaire. À notre grande surprise, tous les épitopes identifiés furent reconnus par des clones T CD4⁺, aucun ne fut trouvé parmi les lymphocytes T CD8⁺. Nous pensons que les peptides d'une longueur de 11 à 18 mers ont pu favoriser la prolifération des lymphocytes T CD4⁺. Il se peut que lors de la création des lignées cellulaires, la croissance des cellules T CD4⁺ fut plus rapide, et que la population ait rapidement surpassé celle des cellules T CD8⁺. D'ailleurs, dans certains cas, nous avons détecté des cellules T CD8⁺ spécifiques lors des premières stimulations et par la suite ces cellules ont arrêté de répondre et ont disparu des lignées cellulaires. Une solution pour isoler des clones T CD8⁺ aurait été de procéder à un tri de cette population de lymphocytes avant la première stimulation, par exemple en procédant avec des billes magnétiques anti-CD4. Sur les 5 épitopes déterminés à partir d'un patient infecté au VHC-3a, la majorité, 4/5 (80%), est retrouvée dans les protéines non structurales, tout comme ce qui a été précédemment démontré pour le génotype 1 (Dielpolder, H.M, et al, 1995, Hoffmann, R.M. et al, 1995, Eckels, D.D., 1999; Godkin, A. et al 2001; Day, C.L. et al, 2002; Penna, A. et al, 2002;

Wertheimer, A.M. et al, 2003; Harcourt, G.C. et al, 2004, Lauer, G.M. et al, 2004; Schulze zur Wiesch, S. et al, 2005).

4.3.3 L'allèle de la molécule DR impliqué dans la présentation antigénique des épitopes non structuraux est DRB1*070101/070102 et pour l'épitope structural l'allèle est DRB1*090102.

La molécule du CMH II ainsi que son allèle impliqué dans la présentation de l'épitope ont été déterminés. Dans la présentation antigénique du CMH II, diverses molécules peuvent être impliquées selon le cas : DR, DP et DQ. Pour tous les épitopes, nous avons déterminé que la molécule impliquée dans la présentation antigénique était DR. Il est important de déterminer l'allèle impliqué pour plusieurs raisons : 1) dans le cas du CMH I des mutations spécifiques dans des allèles spécifiques des molécules A et B ont été associées avec la persistance (Timm, J. et al, 2004; Neumann-Haefelin, C. et al, 2006; Ray, S.C. et al, 2005), 2) certains allèles de la molécule DR du CMH II, DRB1*1101, 0301, et DQB1*0301 ont été associés avec la résolution spontanée (Thursz, M. et al, 1999; Thio, C.L. et al, 2002; Yee, L.J. et al, 2004; Hong, X. et al, 2005) et 3) dans la mise au point de vaccins contre le VHC, il faudrait idéalement identifier des épitopes qui sont présentés par plusieurs allèles à la fois afin de maximiser son efficacité chez la plus grande fraction possible de la population. Pour tous les épitopes ciblés sur les protéines non structurales, nous avons démontré que l'allèle de la molécule DR impliqué dans la présentation antigénique était DRB1*070101/070102 et que pour le seul épitope structural, E2₅₀₄₋₅₂₁, l'allèle était DRB1*090102.

4.3.3 NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, un candidat potentiel dans la mise au point d'un vaccin; E2₅₀₄₋₅₂₁, NS3₁₀₆₄₋₁₀₈₁, NS5a₂₀₇₄₋₂₀₉₁, NS5b₂₄₂₁₋₂₄₃₆, de nouveaux épitopes

Si on parvenait à mettre au point un vaccin couvrant les génotypes 1, 2 et 3, on pourrait couvrir 91% des infections au VHC (<http://hcv.lanl.gov/>). Le vaccin idéal devrait avoir les caractéristiques suivantes pour qu'on puisse espérer guérir l'infection et couvrir le plus de génotypes possible : 1) induire une réponse cellulaire CD8+ et CD4+ multispécifique, 2) vigoureuse, 3) principalement contre les protéines non structurales, et 4) dont les épitopes sont présentés par de nombreux et différents allèles des molécules des CMH I et II et reconnus entre génotypes. Pour les 5 épitopes identifiés, les niveaux de conservation entre les génotypes 3a et 1a sont de 66,7 à 94,4%. Après une recherche sur le site de la « HCV database » (<http://hcv.lanl.gov/>) on a pu mettre en évidence que l'épitope NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆ était déjà identifié (Gerlach, J.T. et al, 2005) alors que les autres étaient en des découvertes. L'épitope NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆ est un épitope immunodominant reconnu par plus de 30% des patients infectés au VHC de divers génotypes, dont la restriction du CMH II fut déterminée comme étant DR11 (Gerlach, J.T. et al, 2005). Ce qui est intéressant, c'est que chez le patient 4757-HAJX, nous avons déterminé que la restriction était DR7. De plus, l'étude de Gerlach et al. (2005), a déterminé que cet épitope était reconnu dans 25 % des cas par des HLA-DRB1 autre que DR11. L'épitope NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆ est immunodominant, reconnu par plusieurs génotypes, et il peut être présenté par divers allèles de la molécule HLA-DRB1, cela suggère qu'il pourrait s'avérer être un bon candidat dans le développement de vaccins composés de peptides immunogéniques. Les autres épitopes sont décrits pour la première fois dans ce travail. Pourtant, certains tel que E2₅₀₄₋₅₂₁, et NS5b₂₄₂₁₋₂₄₃₆, sont conservés entre les génotypes 1a et 3a par respectivement 94,4% et 87,5% (tableau VI). Il faudra plus d'études, particulièrement chez les patients infectés au génotype 3a afin d'obtenir plus d'information au niveau de la restriction des allèles qui

peuvent permettre leur reconnaissance par les molécules DR du CMH II et de déterminer à quel point ils contribuent dans la réponse immunitaire cellulaire contre le VHC.

4.4 Conclusion

4.4.1 Lors de la phase aigüe, l'ARFP n'est pas importante dans la résolution de l'infection au VHC.

Nous avons donc testé la réponse immunitaire cellulaire contre L'ARFP en utilisant des peptides de 12-18 mers se chevauchant par 10-12 acides aminés ou une protéine recombinante, L'ARFP mut8Δ11. De tous les échantillons de PBMCs des patients qui furent testés, plus de 100 si on tient compte des 2 sortes d'antigène, un seul patient a démontré une réponse immunitaire constante pour 3 temps différents d'infection, lorsque L'ARFP mut8Δ11 fut utilisée. Cependant, nous ne pouvons affirmer que cette réponse était spécifique contre L'ARFP. Finalement, nos résultats suggèrent fortement que la réponse immunitaire contre L'ARFP, lors de la phase aigüe de l'infection au VHC chez l'homme, n'est pas importante pour la résolution de l'infection et qu'en accord avec les études publiées précédemment, NS3 est importante de par son immunodominance et la vigueur de la réponse engendrée chez les patients ayant résolu l'infection.

4.4.2 Pour le génotype 3a du VHC, l'épitope NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, pourrait être un bon candidat dans la préparation d'un vaccin, alors que les épitopes E2₅₀₄₋₅₂₁, NS3₁₀₆₄₋₁₀₈₁, NS5a₂₀₇₄₋₂₀₉₁, NS5b₂₄₂₁₋₂₄₃₆, sont des découvertes.

Chez le patient 4757-HAJX, démontrant une réponse cellulaire multispécifique contre le VHC génotype 3a, surtout contre les protéines non structurales, nous avons mis en évidence 5 épitopes : E2₅₀₄₋₅₂₁, NS3₁₀₆₄₋₁₀₈₁, NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, NS5a₂₀₇₄₋₂₀₉₁, NS5b₂₄₂₁₋₂₄₃₆. Tous les épitopes sont restreints par la molécule DR du CMH II et tous sont reconnu par l'allèle DRB1*070101/070102, à l'exception de l'épitope structural E2₅₀₄₋₅₂₁, reconnu par l'allèle DRB1*090102. Finalement, l'épitope NS4b₁₇₅₉₋₁₇₇₆, de par son immunodominance, sa

reconnaissance par le système immunitaire lors l'infection par divers géotypes du VHC et sa reconnaissance par différents allèles de la molécule DR du CMH II, il pourrait s'avérer être un candidat potentiel dans la mise au point d'un vaccin. Les épitopes E2₅₀₄₋₅₂₁, NS3₁₀₆₄₋₁₀₈₁, NS5a₂₀₇₄₋₂₀₉₁, NS5b₂₄₂₁₋₂₄₃₆, sont de nouveaux épitopes jamais décrits auparavant qui demanderont plus d'études afin de comprendre leur importance dans l'infection à l'hépatite C.

4.5 Perspective

4.5.1 L'ARFP

Bien que L'ARFP ne semble pas importante dans la guérison contre le VHC, il ne fait aucun doute qu'elle peut induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires, qui du moins ont permis de confirmer son existence (Vassilaki, A. et al, 2003 ; Boulant, S. et al, 2003; Komurian-Pradel, F. et al, 2004; Bain, C. et al, 2004 ; Troesch, M. et al, 2005; Cohen, M. et al, 2007). De plus, il se pourrait aussi que la réponse contre L'ARFP se développe beaucoup plus tard lors de l'infection et/ou que la réponse soit confinée au foie. La fonction de L'ARFP reste encore inconnue à ce jour. Cependant, des études suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans les dommages au foie ou encore les cancers hépatiques qui se produisent parfois lors de l'infection au VHC (Alam, S.S. et al, 2002 ; Ogata, S. et al, 2002 ; Yeh, C.T. et al, 2000 ; Basu, A. et al, 2004 ; Fiorucci, M. et al, 2007 ; Ma, H.C. et al, 2008). Il se pourrait aussi que cette protéine agisse comme un régulateur. Cette fonction n'étant pas nécessairement en opposition avec son implication possible au niveau du foie, mais plutôt complémentaire. De par sa localisation en début de la polyprotéine, Plus d'études biochimiques et la mise au point récente d'un système de culture cellulaire du VHC *in vitro* pourront surement aider à élucider la fonction d'L'ARFP dans les années à venir.

4.5.2 Cartographie haute résolution des épitopes du VHC génotype 3a

La cartographie des épitopes chez le patient 4757-HAJX pourrait consister en le début d'une étude qui pourrait être faite chez les patients infectés au génotype 3a. Certaines questions auxquelles il pourrait être intéressant de répondre seraient : 1) déterminer à quel point les épitopes reconnus chez le génotype 3a sont retrouvés chez d'autres génotypes, particulièrement le génotype 1a, 2) de savoir s'il y a un nombre minimal ou optimal d'épitopes qui doivent être reconnus pour qu'un patient guérisse du VHC, 3) de savoir à quel point l'avidité des épitopes est importante pour cette résolution de l'infection, 4) de déterminer les épitopes qui peuvent être reconnus par plusieurs allèles des molécules des CMH I et II, et 5) de déterminer si certains épitopes reconnus par les cellules T CD8+ peuvent aussi être reconnus par les cellules T CD4+. Une telle étude permettrait de mieux comprendre les différences entre génotypes, et aussi les similarités dans l'espoir de mettre au point un vaccin contre l'hépatite C. Idéalement, ce vaccin peptidique devrait être multispécifique, très immunogénique, dirigé contre les protéines non structurales, protecteur contre différents génotypes, présenté par différents allèles des molécules du CMH I et II.

Bibliographie

- Adinolfi LE, Utili R, Andreana A, Tripodi MF, Marracino M, Gambardella M, Giordano M, Ruggiero G.** (2001). Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 46, 1677-1683.
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX.** (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells *via* low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 12766-12771.
- Alam SS, Nakamura T, Naganuma A, Nozaki A, Nouse K, Shimomura H, Kato N.** (2002). Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: the core protein-encoding region. *Acta Med Okayama* 56, 141-147.
- Alter, M.J., Seeff, L.B., Bacon, B.R., Thomas, D.L., Rigsby, M.O., Di Bisceglie, A.M.** (2004) Testing for hepatitis C virus infection should be routine for persons at increased risk for infection. *Ann Intern Med* 141, 715-717.
- Alter MJ, Seeff LB.** (2000). Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 20, 17-35.
- Appel N, Herian U, Bartenschlager R.** (2005). Efficient rescue of hepatitis C virus RNA replication by trans-complementation with nonstructural protein 5A. *J Virol* 79, 896-909.
- Bain C, Parroche P, Lavergne JP, Duverger B, Vieux C, Dubois V, Komurian-Pradel F, Trépo C, Gebuhrer L, Paranhos-Baccala G, Penin F, Inchauspé G.** (2004) Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 78, 10460-10469.
- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Bréchet C.** (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 1200-2005.
- Bartosch B, Cosset FL.** (2006). Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348,1-12.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL.** (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* 197, 633-642.
- Basu A, Steele R, Ray R, Ray RB.** (2004). Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 85, 2299-2306.

- Behrens SE, Tomei L, De Francesco R.** (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15, 12-22.
- Berzofsky, J.A., Ahlers, J.D., Janik, J., Morris, J., Oh, S., Terabe, M., Belyakov, I.M.** Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. (2004) *J Clin Invest* 114, 450-462.
- Bjoro K, Frøland SS, Yun Z, Samdal HH, Haaland T.** (1994). Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. 1: *N Engl J Med*, 331, 1607-1611.
- Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y.** (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. 80, 6964-6972.
- Bodelón G, Labrada L, Martínez-Costas J, Benavente J.** (2002). Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells: viroporin activity of the S1-encoded nonstructural p10 protein. *J Biol Chem* 277, 17789-96.
- Bonavita MS, Franco A, Paroli M, Santilio I, Benvenuto R, De Petrillo G, Levrero M, Perrone A, Balsano C, Barnaba V.** (1993). Normalization of depressed natural killer activity after interferon-alpha therapy is associated with a low frequency of relapse in patients with chronic hepatitis C. *Int J Tissue React* 15, 11-16.
- Boulant S, Becchi M, Penin F, Lavergne JP.** (2003). Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem* 278, 45785-45792.
- Bowen DG, Walker CM.** (2005) Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, 436, 946-952.
- Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL.** (2005). The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25,105-117.
- Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, Zanzi D, Ottaiano A, Manzo C, Kärre K, Zappacosta S.** (1999). Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 29, 4022-4029.
- Carrère-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J.** (2002) Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 76, 3720-3730

- Castellino F, Germain RN.** (2006). Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* 24, 519-540.
- Choi J, Xu Z, Ou JH.** (2003). Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting. *Mol Cell Biol* 23, 1489-1497
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M.** (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
- Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J.** (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol.* 87, 1075-84.
- Cohen M, Bachmatov L, Ben-Ari Z, Rotman Y, Tur-Kaspa R, Zemel R.** (2007). Development of specific antibodies to an ARF protein in treated patients with chronic HCV infection. *Dig Dis Sci* 52, 2427-2432.
- Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM.** (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10, 439-449.
- Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB.** (1997). Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 109, 451-457.
- Cornberg M, Chen AT, Wilkinson LA, Brehm MA, Kim SK, Calcagno C, Gherzi D, Puzone R, Celada F, Welsh RM, Selin LK.** (2006). Narrowed TCR repertoire and viral escape as a consequence of heterologous immunity. *J Clin Invest* 116, 1443-1456.
- Cox AL, Mosbrugger T, Lauer GM, Pardoll D, Thomas DL, Ray SC.** (2005). Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* 42, 104-112.
- Cox AL, Page K, Bruneau J, Shoukry NH, Lauer GM, Kim AY, Rosen HR, Radziewicz H, Grakoui A, Fierer DS, Branch AD, Kaplan DE, Chang KM.** (2009). Rare Birds in North America: Acute Hepatitis C Cohorts. *Gastroenterology* 136:26–31.
- Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD.** (2002). Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 76, 12584-12595.

- Della Chiesa M, Sivori S, Castriconi R, Marcenaro E, Moretta A.** (2005). Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells. *Trends Microbiol* *13*, 128-136.
- Deignan T, Curry MP, Doherty DG, Golden-Mason L, Volkov Y, Norris S, Nolan N, Traynor O, McEntee G, Hegarty JE, O'Farrelly C.** (2002). Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* *37*, 101-108.
- Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR.** (1997). Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* *71*, 6011-6009.
- Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR.** (1995). Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* *346*, 1006-1007.
- Dittmann S, Roggendorf M, Dürkop J, Wiese M, Lorbeer B, Deinhardt F.** (1991). Long-term persistence of hepatitis C virus antibodies in a single source outbreak. *J Hepatol* *13*, 323-327.
- Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, Golenbock DT, Finberg RW, Kurt-Jones E, Szabo G.** (2004). Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology*, *127*, 1513-1524.
- Dumont S, Cheng W, Serebrov V, Beran RK, Tinoco I Jr, Pyle AM, Bustamante C.** (2006). RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* *439*, 105-108.
- Dreux M, Pietschmann T, Granier C, Voisset C, Ricard-Blum S, Mangeot PE, Keck Z, Fong S, Vu-Dac N, Dubuisson J, Bartenschlager R, Lavillette D, Cosset FL.** (2006) High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry *via* activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* *281*, 18285-18295.
- Eckels DD, Wang H, Bian TH, Tabatabai N, Gill JC.** (2000). Immunobiology of hepatitis C virus (HCV) infection: the role of CD4 T cells in HCV infection. *Immunol Rev* *174*, 90-97.

- Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K.** (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* *76*, 5974-5984
- Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM.** (2001). The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* *15*, 883-895.
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM.** (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* *446*, 801-805.
- Ewart GD, Sutherland T, Gage PW, Cox GB.** (1996). The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol* *70*, 7108-7115.
- Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzer A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH.** (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 15394-15399.
- Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, et al.** (1992). Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* *258*, 135-140.
- Fehniger TA, Caligiuri MA.** (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* *97*, 14-32.
- Ferreon JC, Ferreon AC, Li K, Lemon SM.** (2005). Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Biol Chem* *280*, 20483-20492.
- Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr.** (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*, 2986-2991.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J.** (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* *347*, 975-982.

- Fiorucci M, Boulant S, Fournillier A, Abraham JD, Lavergne JP, Paranhos-Baccala G, Inchauspé G, Bain C.** (2007). Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol* 88, 1149-1162.
- Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM.** (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 78, 3480-2488
- Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC.** (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 4498-4503.
- Gerlach JT, Ulsenheimer A, Grüner NH, Jung MC, Schraut W, Schirren CA, Heeg M, Scholz S, Witter K, Zahn R, Vogler A, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM.** (2005). Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virol* 79, 12425-12433.
- Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR.** (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117, 933-41.
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G.** (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195, 327-333.
- Gesteland RF, Weiss RB, Atkins JF.** (1992). Recoding: reprogrammed genetic decoding. *Science* 257, 1640-1641.
- Godkin A, Jeanguet N, Thursz M, Openshaw P, Thomas H.** (2001) Characterization of novel HLA-DR11-restricted HCV epitopes reveals both qualitative and quantitative differences in HCV-specific CD4+ T cell responses in chronically infected and non-viremic patients. *Eur J Immunol* 31, 1438-1446.
- Golden-Mason L, Rosen HR.** (2006). Natural killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies? *Liver Transpl* 12, 363-372.
- Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D.** (2004) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77, 5487-5492.

- Guidotti LG, Borrow P, Brown A, McClary H, Koch R, Chisari FV.** (1999). Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. *J Exp Med*, *189*, 1555-1564.
- Grakoui, A, Hanson, H.L., Rice, C.M.** (2001) Bad time for Bonzo? Experimental models of hepatitis C virus infection, replication, and pathogenesis. *Hepatology* *33*, 489-95.
- Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ.** (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* *535*, 34-38
- Grüner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiaroni M, Cerny A, Pape GR.** (2000). Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* *181*, 1528-36.
- Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL.** (2005). NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* *17*, 29-35.
- Harcourt GC, Lucas M, Sheridan I, Barnes E, Phillips R, Klenerman P.** (2004) Longitudinal mapping of protective CD4+ T cell responses against HCV: analysis of fluctuating dominant and subdominant HLA-DR11 restricted epitopes. *J Viral Hepat* *11*, 324-331.
- Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, Grandien A, Ljunggren HG, Smyth MJ, Chambers BJ.** (2004). NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells *in vivo* and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol*, *172*, 123-129.
- Hoffmann RM, Günther C, Diepolder HM, Zachoval R, Eissner HJ, Forst H, Anthuber M, Paumgartner G, Pape GR.** (1995). Hepatitis C virus infection as a possible risk factor for ductopenic rejection (vanishing bile duct syndrome) after liver transplantation. *Transpl Int* *8*, 353-359.
- Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC, Wu GL.** (2005) Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* *11*, 7302-7307.
- Horsmans Y, Berg T, Desager JP, Mueller T, Schott E, Fletcher SP, Steffy KR, Bauman LA, Kerr BM, Averett DR.** (2005). Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology*, *42*, 724-731.

- Iwasaki A, Medzhitov R.** (2004). Toll like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, *5* : 987-995
- Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Sekiya H, Hijikata M, Shimotohno K.** (1992). Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* *189*, 119-27.
- Komurian-Pradel F, Rajoharison A, Berland JL, Khouri V, Perret M, Van Roosmalen M, Pol S, Negro F, Paranhos-Baccalà G.** (2004). Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* *40*, 900-909.
- Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgilio S, Balestrieri A, Purcell RH, Cao A, Farci P.** (1994). Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* *343*, 388-390.
- Lavillette D, Bartosch B, Nourrisson D, Verney G, Cosset FL, Penin F, Pêcheur EI.** (2006) Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* *281*, 3909-3917.
- Lauer, G.M., Walker, B.D.** (2001) Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* *345*, 41-52.
- Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, Robbins GK, Casson DR, Reiser M, Dusheiko G, Allen TM, Chung RT, Walker BD, Klenerman P.** (2004) High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* *127*, 924-936.
- Lauer GM, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, Schulze Zur Wiesch J, Paranhos-Baccalà G, Sheridan I, Casson DR, Reiser M, Gandhi RT, Li B, Allen TM, Chung RT, Klenerman P, Walker BD.** (2005). Full-breadth analysis of CD8⁺ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection and early therapy. *J Virol* *79*, 12979-12988.
- Lechner F, Sullivan J, Spiegel H, Nixon DF, Ferrari B, Davis A, Borkowsky B, Pollack H, Barnes E, Dusheiko G, Klenerman P.** (2000). Why do cytotoxic T lymphocytes fail to eliminate hepatitis C virus? Lessons from studies using major histocompatibility complex class I peptide tetramers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *355*, 1085-1092.
- Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM.** (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 2992-2997.

- Liang TJ, Heller T.** (2004). Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* *127*, S62-71.
- Ljunggren HG, Kärre K.** (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* *11*, 237-244.
- Ljunggren HG, Kärre K.** (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* *162*, 1745-1759.
- Levin MK, Gurjar M, Patel SS.** (2005). A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 429-435.
- Levy S, Todd SC, Maecker HT.** (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* *16*, 89-109.
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA.** (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* *6*, 1348-1354.
- Lodoen MB, Lanier LL.** (2005). Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol* *3*, 59-69.
- Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R.** (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* *285*, 110-113.
- Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R.** (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem.* *278*, 20358-20366.
- Ma HC, Lin TW, Li H, Iguchi-Arigo SM, Arigo H, Chuang YL, Ou JH, Lo SY.** (2008). Hepatitis C virus L⁺ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *J Biomed Sci* *15*, 417-425.
- Mackenzie J.** Wrapping things up about virus RNA replication. (2005) *Traffic* *6*, 967-977.
- Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fong S, Lai MM.** (2006). Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol*, *80*, 866-874.

- Manns, M.P., Cornberg, M., Wedemeyer, H.** (2001) Current and future treatment of hepatitis C. *Indian J Gastroenterol* 20 Suppl 1:C47-51.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J.** (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66, 3225-3229.
- Masci P, Bukowski RM, Patten PA, Osborn BL, Borden EC.** (2003) New and modified interferon alphas: preclinical and clinical data. *Curr Oncol Rep* 5, 108-113.
- McMichael AJ, O'Callaghan CA.** (1998). *J Exp Med* 187, 1367-1371.
- McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM.** (2007). Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 2879-2884.
- Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH, Bukh J.** (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4560-4565.
- Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, Sponzilli I, Vaccarezza M, Cocco L, Zauli G, Secchiero P, Manzoli FA, Vitale M.** (2004). Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 104, 2418-2424
- Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C.** (1996). Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 98, 706-714.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC.** (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313-319.
- Mondelli MU, Cerino A, Segagni L, Meola A, Cividini A, Silini E, Nicosia A.** (2001) Hypervariable region 1 of hepatitis C virus: immunological decoy or biologically relevant domain? *Antiviral Res* 52, 153-159.
- Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V.** (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78, 13278-13284.

- Mundt B, Kühnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S.** (2003). Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* *17*, 94-96.
- Naoumov NV.** (1999). Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. *J Hepatol* *31* Suppl 1, 84-87.
- Neumann-Haefelin C, McKiernan S, Ward S, Viazov S, Spangenberg HC, Killinger T, Baumert TF, Nazarova N, Sheridan I, Pybus O, von Weizsäcker F, Roggendorf M, Kelleher D, Klenerman P, Blum HE, Thimme R.** (2006) Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology* *43*, 563-572.
- Ogata S, Nagano-Fujii M, Ku Y, Yoon S, Hotta H.** (2002). Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol* *40*, 3625-3630.
- Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA.** (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* *122*, 366-375.
- Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T, Omata M.** (2005). Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* *41*, 1004-1012.
- Patton HM, Patel K, Behling C, Bylund D, Blatt LM, Vallée M, Heaton S, Conrad A, Pockros PJ, McHutchison JG.** (2004). The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* *40*, 484-490.
- Pavlović D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N.** (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *100*, 6104-6108.
- Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM.** (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* *39*, 5-19.
- Penna A, Missale G, Lamonaca V, Pilli M, Mori C, Zanelli P, Cavalli A, Elia G, Ferrari C.** (2002) Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* *35*, 1225-1236.

- Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R.** (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103,7408-7413.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S.** (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938-941.
- Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, Zeuzem S, Younossi Z, Albrecht J.** (2003). Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 38, 75-85.
- Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P, Haber PS, Marinos G, Levy MH, Kaldor JM, Dolan KA, Ffrench RA, Lloyd AR, Rawlinson WD.** (2004). Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis,* 189, 1846-1855.
- Racanelli V, Frassanito MA, Leone P, Galiano M, De Re V, Silvestris F, Dammacco F.** (2006). Antibody production and *in vitro* behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J Virol* 80, 3923-3934.
- Racanelli V, Rehermann B.** (2003). Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol,* 24, 456-464.
- Ray SC, Fanning L, Wang XH, Netski DM, Kenny-Walsh E, Thomas DL.** (2005). Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J Exp Med* 201, 1753-1759.
- Rehermann B, Nascimbeni M.** (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5, 215-229.
- Rosen, H.R., Martin, P.** (2000) Viral hepatitis in the liver transplant recipient. *Infect Dis Clin North Am* 14, 761-784.
- Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malé PJ, Mentha G, Spahr L, Zarski JP, Borisch B, Hadengue A, Negro F.** (2000). Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol,* 33, 106-115.
- Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L.** (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* 285, 139-173

- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A.** (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21, 5017-25.
- Schmidt-Mende J, Bieck E, Hugle T, Penin F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D.** (2001) Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 276, 44052-44063.
- Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung RT, Walker BD.** (2005). Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 175, 3603-3613.
- Seeff LB.** (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36, S35-46
- Selby MJ, Choo QL, Berger K, Kuo G, Glazer E, Eckart M, Lee C, Chien D, Kuo C, Houghton M.** (1993). Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J Gen Virol* 74, 1103-1113.
- Serebrov V, Pyle AM.** (2004). Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 430, 476-80.
- Shirai M, Arichi T, Chen M, Masaki T, Nishioka M, Ikeda K, Takahashi H, Enomoto N, Saito T, Major ME, Nakazawa T, Akatsuka T, Feinstone SM, Berzofsky JA.** (1999). T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 162, 568-576.
- Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM.** (2004) Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 58, 391-424.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A.** (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42, 962-973.
- Smyk-Pearson S, Tester IA, Lezotte D, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Rosen HR.** (2006). Differential antigenic hierarchy associated with spontaneous recovery from hepatitis C virus infection: implications for vaccine design. *J Infect Dis* ,, 194, 454-463.

- Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J.** (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291,1959-1962.
- Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, Walker CM.** (2003) Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197, 1645-1655.
- Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV.** (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15669-15674
- Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, Chiba J, Harada S, Saito I, Miyamura T.** (1995) Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol* 76, 53-61.
- Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B.** (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6, 578-582.
- Terrazzano G, Pisanti S, Grimaldi S, Sica M, Fontana S, Carbone E, Zappacosta S, Ruggiero G.** (2004). Interaction between natural killer and dendritic cells: the role of CD40, CD80 and major histocompatibility complex class I molecules in cytotoxicity induction and interferon-gamma production. *Scand J Immunol* 59, 356-362.
- Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV.** (2001) Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194, 1395-1406.
- Thomas, D.L., Seeff, L.B.** (2005) Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 9, 383-398,
- Timm J, Roggendorf M.** (2007). Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. *World J Gastroenterol*, 13, 4808-4817.
- Timm J, Lauer GM, Kavanagh DG, Sheridan I, Kim AY, Lucas M, Pillay T, Ouchi K, Reyor LL, Schulze zur Wiesch J, Gandhi RT, Chung RT, Bhardwaj N, Klenerman P, Walker BD, Allen TM.** (2004) CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200, 1593-1660.

- Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski J, Carrington M, Thomas DL.** (2002) HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *J Virol* 76, 4792-4797.
- Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC.** (1999). Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet* 354, 2119-2124.
- Trepo C.** (2000). Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 7, 250-257.
- Trinchieri G.** (2003). The choices of a natural killer. *Nat Immunol* 4, 509-510.
- Trinchieri G.** (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187-376.
- Troesch M, Jalbert E, Canobio S, Boulassel MR, Routy JP, Bernard NF, Bruneau J, Lapointe N, Boucher M, Soudeyns H.** (2005). Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* 19, 775-784.
- Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A.** (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66, 1476-1483.
- Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, Mavromara P.** (2002). Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 277, 17713-17721.
- Vassilaki N, Mavromara P.** (2003). Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV L'ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem* 278, 40503-40513.
- Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD.** (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7, 710-721.
- Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B.** (2002). Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 169, 3447-3458.
- Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M, et al.** (1991) Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180, 842-848

- Welsh RM, Selin LK.** (2002). No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2, 417-426.
- Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R.** (2004). Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16004-16009.
- Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR.** (2003) Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 37, 957-989.
- Wolf M, Dimitrova M, Baumert TF, Schuster C.** (2008). The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res.* 36(9):3054-3064.
- Wölk B, Sansonno D, Kräusslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D.** (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 74, 2293-2304
- Woollard DJ, Grakoui A, Shoukry NH, Murthy KK, Campbell KJ, Walker CM.** (2003). Characterization of HCV-specific Patr class II restricted CD4+ T cell responses in an acutely infected chimpanzee. *Hepatology* 38, 1297-1306.
- Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J.** (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 16;20, 3840-3848.
- Yee LJ.** (2004). Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 5, 237-345.
- Yeh CT, Lo SY, Dai DI, Tang JH, Chu CM, Liaw YF.** (2000). Amino acid substitutions in codons 9-11 of hepatitis C virus core protein lead to the synthesis of a short core protein product. *J Gastroenterol Hepatol* 15, 182-191.
- Yewdell JW, Del Val M.** (2004). Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity* 21, 149-153.
- Yi M, Lemon SM.** (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77, 3557-3568.
- Yukse K, Chen WL, Chien D, Ou JH.** (2009). Ubiquitin-independent degradation of hepatitis C virus F protein. *J Virol.* 83(2):612-621.

