

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Action de la matrice extra-cellulaire sur le métabolisme
de l'hépatocyte infecté par le virus de l'hépatite C**

par

Jean-Baptiste LOUBERT

Département des Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M. Sc.)
en Sciences Biomédicales

Décembre 2007

© LOUBERT, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce Mémoire intitulé :

Action de la matrice extra-cellulaire sur le métabolisme de l'hépatocyte
infecté par le virus de l'hépatite C

présenté par :

LOUBERT Jean-Baptiste

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Steven Richard MARTIN, président-rapporteur

Manuela SANTOS, membre du jury

Marc BILODEAU, directeur de recherche

Résumé

Introduction : Le virus de l'hépatite C (VHC) affecte entre 170 et 350 millions de personnes de par le monde. Ce virus contient un génome produisant une dizaine de protéines, dont les effets sur la survie et la transformation cellulaires, et plus particulièrement sur l'induction de l'apoptose, sont encore largement sujets à controverse. Associée à l'infection survient une réaction inflammatoire entraînant le développement de la fibrose hépatique. Il s'agit d'une accumulation de matrice extra-cellulaire (MEC), riche en collagène de type I, qui, à long terme, désorganise le parenchyme et diminue la fonction hépatique. La voie ERK 1/2, essentielle à la multiplication et à la différenciation cellulaire, est activable par le collagène et par le VHC. Lorsque dérégulée, elle peut être à l'origine d'hépatocarcinomes. Notre hypothèse est que le VHC permet aux cellules qu'il infecte de résister à l'apoptose. Cette résistance serait consécutive à l'activation permanente de la voie des ERK1/2, par le VHC, et par l'accumulation de collagène provenant de la fibrose. En plus, l'accumulation de MEC, corrélée à une augmentation différentielle des activités enzymatiques de l'aspartate aminotransférase (AST) et de l'alanine aminotransférase (ALT), révèle une profonde modification du métabolisme hépatocytaire des acides aminés.

Méthodes : Nous avons induit l'apoptose de cellules de la lignée hépatocytaire Huh7 cultivées en présence de différentes concentrations de collagène de type I par l'étoposide. Le taux d'apoptose a été évalué selon des critères morphologiques bien définis suite à une coloration au Hoechst 33258. Des immuno-buvarpages ont été réalisés sur des échantillons de foie infectés par le VHC et sur les lignées Huh7, 9-13 (Huh7 infectée par un réplicon sous-génomique du VHC), et Tx (Lignée 9-13 "guérie" par un traitement à l'interféron α) cultivées sur des concentrations croissantes de collagène pour étudier l'évolution de l'activité ERK1/2. Enfin, les activités AST et ALT ont été mesurées dans des échantillons de foies humains et murins, dans des biopsies de foies de patients présentant différents degrés de fibroses, et au sein d'hépatocytes humains isolés provenant de foies de patients infectés ou non pas le VHC.

Résumé

Résultats : La lignée cellulaire contenant le réplicon sous-génomique du VHC était significativement plus résistante à l'apoptose que les deux autres lignées cellulaires n'exprimant pas les protéines virales (Huh-7 : 13% +/-1,5; 9-13 : 4% +/-0,6 (P<0,005) ;Tx : 8% +/-0,7). Lorsque nous avons induit l'apoptose de ces lignées en présence d'une densité croissante de collagène, nous avons observé une diminution de la mortalité. En cultivant les lignées sur une densité croissante de collagène, nous constatons une plus grande activation de ERK1. Sur des homogénats de foies humains, l'activité de ERK 1, bien qu'hétérogène, semble plus importante dans les foies infectés par le VHC par rapport aux foies non infectés, et le ratio AST/ALT augmente alors que la fibrose est plus marquée (Foies normaux : 2,4 +/-0,1, vs Foies cirrhotiques 4,1 +/-0,3, P<0,001). Les biopsies montrent une corrélation entre le ratio AST/ALT et le degré de fibrose évoluée. Enfin, les ratios AST/ALT des culots d'hépatocytes isolés sont significativement plus élevés dans les échantillons de foies VHC + (6,2 +/- 1,5) que dans ceux provenant de foies normaux (2,1 +/- 0,2)(P=0,013)

Conclusion : Ces résultats suggèrent que le VHC et le collagène induisent non seulement une résistance à l'apoptose chez les cellules infectées mais en plus que cette résistance, dépendante de la voie ERK 1/2, entraîne de profondes modifications métaboliques des acides aminés.

Mots-clés : foie, hépatocyte, virus de l'hépatite C, AST, ALT, aminotransférase, transaminase, fibrose, cirrhose, métabolisme, acide aminé, alanine, aspartate, MAPK.

Abstract

Introduction : The hepatitis C virus (HCV) affects between 170 and 350 million people worldwide. The HCV genome is transcribed and translated into ten proteins, which affect cellular survival and transformation, and more particularly the induction of apoptosis. Associated with the infection, an inflammatory reaction occurs leading to the development of hepatic fibrosis, which is an accumulation of type I collagen rich extracellular matrix (ECM). As time goes on, ECM accumulation disorganizes the parenchyma and decreases hepatic function. The ERK 1/2 pathway, activated by collagen and HCV, is essential for cell multiplication and differentiation. However, it may be at the origin of liver cells transformation and then provoke the development of hepatocarcinoma. Our hypothesis is that HCV and collagen help the infected hepatocytes to resist apoptosis by inducing ERK1/2 pathway activation. Moreover, the accumulation of ECM, correlated with different changes in enzymatic activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), reveals a deep modification of hepatocyte amino acids metabolism.

Methods : We induced apoptosis in hepatic cell lines Huh7 cultivated in the presence of increasing type I collagen concentrations by the use of etoposide. Apoptosis rate was measured by the identification of pre-defined morphological changes using Hoechst 33258 cell nucleus dye. Western-blotting was carried out on liver samples infected by HCV and on the Huh7, 9-13 (Huh7 infected by a sub-genomic HCV replicon), and Tx (Line 9-13 "cured" by treatment with interferon α) cell lines cultivated on increasing collagen concentrations to study the evolution of their ERK1/2 activity. Lastly, AST and ALT activities were measured in human and murine liver samples, in livers biopsies of patients presenting various degrees of fibrosis, and in isolated human hepatocytes coming from livers from human HCV-infected and normal livers.

Results : The HCV replicon cell line was significantly more resistant to apoptosis compared to the 2 other cell lines (Huh-7: 13% \pm 1,5; 9-13: 4% \pm 0,6 ($P < 0,005$); Tx: 8% \pm

Abstract

0,7). When apoptosis was induced in these cell lines in the presence of increasing densities of collagen, we observed a reduction of mortality. When cell lines were cultured on increasing densities of collagen, we noticed an increasing activity of ERK1. On human liver homogenates, the ERK 1 activities, although heterogeneous, appeared more important in the HCV infected livers, and AST/ALT ratios increased following the fibrosis (normal livers : 2,4 +/-0,1, vs cirrhotic livers : 4,1+/-0,3, $P < 0,001$). AST/ALT ratios were correlated with the degree of fibrosis when investigating on biopsies obtained from HCV-infected patients. Finally, AST/ALT ratios of isolated hepatocytes from HCV + livers (6,2 +/-1,5) were significantly higher than ratios obtained from normal livers (2,1 +/-0,2) ($P=0,013$)

Conclusion : These results suggest that HCV and collagen do induce a state of resistance to apoptosis in infected cells, and that this resistance, dependent on the ERK 1/2 pathway, involves deep modifications of the amino acid metabolism.

Keywords : liver, hepatocyte, hepatitis C virus, AST ALT, aminotransferase, fibrosis, cirrhosis, metabolism, amino-acid, alanin, aspartate, MAPK

Liste des abréviations

- α -SMA : α -Smooth Muscle Actine (actine de muscle lisse de type α)
- Ac I^R : Anticorps primaires
- Ac II^R : Anticorps secondaires
- ALT : ALanine aminoTransférase
- APRI : AST to platelet ratio index
- AST : ASpartate aminoTransférase
- BSA : Bovin Serum Albumin (Albumine de sérum de bovin)
- C : Core (Capside)
- CHE : Cellules hépatiques étoilées
- DMSO : Di-Méthyl-SulfOxyde
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- E.C. : Enzymatic classification (Classification enzymatique internationale)
- EGF : Epithelium Growth Factor (Facteur de croissance épithelial)
- F4 : Stade cirrhotique
- FN : Foie normal
- Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2 (protéine liée au récepteur de facteur de croissance 2)
- HEPES : acide N-2-Hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique
- HPLC : High pressure liquid chromatography (Chromatographie liquide à haute pression)
- HGF : Hepatic growth factor
- HRP : Horseradish Peroxidase (Peroxidase de raifort)
- LEC : Luminescence Electro Chimique
- MAPK : Mitogen Activating Protein Kinase (Protéine kinase activée par les mitogènes)
- MEC : Matrice extra-cellulaire
- NBCS : New borned calf serum (sérum de veau nouveau-né)
- NF- κ B : nuclear factor-kappa B (Facteur nucléaire kappa B)
- NS : Protéine non structurale
- PBS : Phosphate buffered saline. (Solution saline tamponnée au phosphate)

Liste des abréviations

- PBST : Phosphate buffered saline + 0,05% Tween (Solution tamponnée au phosphate + Tween 0,5%)
- PDGF : Platelet derived growth factor (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)
- PIP₃ : Phosphatidyl-inositol -3 phosphate
- PI3K : Phosphoinositide-3 Kinase
- PKA : Protéine kinase A
- PKC : Protéine kinase C
- PKR : Protéine kinase RNA
- pMAPK : MAPK phosphorylées (ERK1/2 phosphorylées)
- PPAR- α : Peroxysome proliferator activated receptor α (Récepteur α activé par la prolifération de peroxisomes)
- PVDF : PolyVinyliDene Fluoride
- REG : Réticulum endoplasmique granulaire
- REL : Réticulum endoplasmique lisse
- RMN : Résonance magnétique nucléaire
- RXR α : Retinoid X Receptor α (Récepteur α pour les rétinoïdes X)
- SDS : sodium dodecyl sulfate (Dodécyl sulfate de sodium)
- SVF : Sérum de veau fœtal
- STAT : Signal transducer and activator of transcription protein (Protéine transductrice du signal et activatrice de la transcription)
- TAA : Thioacétamide
- TGF- β : Facteur de croissance transformant β
- tMAPK : MAPK totales (ERK1/2 totales)
- TIMP : Inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase (Tissue inhibitor of metalloproteinase)
- VHC : Virus de l'hépatite C
- VLDL : Very Low Density Lipoprotein (Lipoprotéine à très faible densité)

Table des matières

I. Introduction.....	4
A. Le foie normal et pathologique.....	5
1. L'état normal du foie.....	6
a) Description anatomique, fonctionnelle et histologique.....	6
b) Les cellules hépatiques et leur environnement.....	9
(1) Les hépatocytes.....	10
(2) Les cellules de Küpffer.....	10
(3) Les cellules étoilées.....	11
(4) Les cellules endothéliales.....	11
(5) Les lymphocytes hépatiques.....	11
c) Fonctions hépatiques.....	12
(1) Le métabolisme hépatique.....	12
(2) La détoxification.....	13
d) La matrice extracellulaire normale.....	13
2. Un état pathologique : la fibrose.....	14
a) Description.....	14
b) La progression de la fibrose.....	18
c) Score de Ishak.....	19
d) La cirrhose et ses implications cliniques.....	19
3. Les principales protéines hépatiques utilisées pour mesurer les atteintes hépatiques.....	20
a) Les aminotransférases.....	20
(1) ASpartate aminoTransférase (AST).....	21
(2) ALanine aminoTransférase (ALT).....	22
b) Autres enzymes et protéines.....	23
(1) Phosphatase alcaline.....	23
(2) Gamma glutamyl transpeptidase.....	23
(3) L'alpha2 macroglobuline (A2M).....	24

Table des matières

4. Les marqueurs de la fibrose du foie	24
a) Biopsie.....	24
(1) Évaluation morphologique	24
(2) Évaluation biochimique (dosage d'hydroxyproline)	25
b) Des marqueurs physiologiques : les enzymes hépatiques.....	25
(1) Score APRI.....	25
(2) FIBROTEST.....	26
(3) FibroMètre.....	26
(4) Le ratio AST/ALT (AS/LT)	27
(5) Autres techniques.....	28
c) Une méthode physique : l'élastographie	28
5. Le virus de l'hépatite C (VHC).....	28
a) Description générale.....	29
b) Le VHC et les voies de régulation des cellules-hôtes.....	30
c) Fibrose et VHC	32
B. Problématique et hypothèses.....	33
II. Matériel et méthodes	36
A. Matériels.....	37
B. Méthodes opératoires.....	37
1. Préparation des échantillons	37
a) Animaux	37
b) Induction expérimentale de la fibrose hépatique	37
c) Foies humains	38
(1) Échantillons de foies humains et biopsies.....	38
(2) Culots d'hépatocytes humains.....	38
d) Lignées cellulaires	39
2. Dosage de protéines selon la méthode de Bradford.....	40
3. Analyse protéique	41
a) Préparation des échantillons, migration et transfert.....	41

Table des matières

b) Immuno-buvar dage.....	41
4. Boîtes de Pétri de collagène.....	43
5. Mesures des AST/ALT.....	43
a) Mesure des activités intra-cellulaires d'AST et d'ALT	43
b) Mesure de l'activité d'AST et d'ALT relarguée par les cellules.....	44
6. Décompte de l'apoptose au microscope à fluorescence.....	44
C. Tests statistiques.....	45
III. Résultats	46
A. La résistance à l'apoptose.....	47
1. La résistance à l'apoptose conférée par le VHC.....	47
2. La résistance à l'apoptose conférée par le collagène	49
B. L'activation des MAPK.....	51
1. Activation des MAPK par le collagène.....	52
2. Activation des MAPK dans des homogénats de foies de patients VHC positifs ou négatifs	53
C. L'origine de la modulation du ratio AST/ALT sérique chez les patients ayant un foie fibrotique.....	55
1. Mesures d'activité AST et ALT dans différents échantillons	55
a) Activités dans des échantillons de foies homogénéisés normaux, F4-HCV et F4 non-HCV	55
b) Activités dans des biopsies de foies normaux et infectés par le VHC.....	57
c) Activités des hépatocytes isolés de foies normaux et infectés par le VHC.....	59
d) Activités dans des foies de souris normaux et fibrotiques	61
2. Les modulations des concentrations de l'aspartate et de l'alanine intra-hépatocytaires.....	63
IV. Discussion	65
A. Collagène, VHC et résistance à l'apoptose	66
1. Résistance à l'apoptose conférée par le réplicon sous-génomique du VHC.....	66
2. Résistance à l'apoptose conférée par la présence de collagène.....	67

Table des matières

B. L'action du VHC et de la fibrose sur le métabolisme hépatocytaire	69
V. Conclusion	70
A. La fibrose hépatique	71
B. Le stress hépatocytaire et son métabolisme	71
C. Perspectives	72
1. Perspectives à court terme et compléments d'études	72
2. Perspectives à moyen et long terme	73
VI. Bibliographie et références	i

Liste des tableaux

<i>Tableau I : Évaluation de la fibrose par score de Ishak (Traduction libre)⁴⁶.</i>	<u>19</u>
<i>Tableau II : Morphologie des lignées cellulaires utilisées.</i>	<u>40</u>
<i>Tableau III : Fournisseurs et dilutions des anticorps primaires et secondaires.</i>	<u>42</u>

Liste des figures

Figure 1: Aspect du tractus gastro-intestinal	5
Figure 2 : Schéma représentant la structure d'un lobule hépatique	7
Figure 3 : Les capillaires hépatiques et leurs structures adjacentes.	8
Figure 4 : L'hépatocyte et son environnement cellulaire direct.	9
Figure 5 : Coupes histologiques de foies atteints de différents degrés de fibrose.	15
Figure 6 : Séquence pathogénique de l'activation des CHE et de l'accumulation de la MEC.	16
Figure 7 : Répertoire des activités possibles des cellules hépatiques étoilées activées.	17
Figure 8 : Évolution d'un foie normal vers la fibrose ³⁹	18
Figure 9 : Comparaison entre un foie sain et un foie cirrhotique.	20
Figure 10 : Représentation de l'AST. On distingue, au milieu, le co-enzyme pyridoxal phosphate, destiné à catalyser la réaction de transamination.	22
Figure 11 : Représentation de la réaction catalysée par l'aspartate aminotransferase.	22
Figure 12 : Équation de la réaction catalysée par l'ALT.	23
Figure 13 : Organisation du génome du VHC et découpage des protéines virales	29
Figure 14 : Aperçu d'une méthode de dérégulation utilisée par le VHC pour activer la voie ERK-MAPK afin de maintenir une croissance cellulaire continue et ainsi, perpétuer l'infection.	30
Figure 15 : Voies proposées pour l'activation de la fibrogenèse par le VHC	33
Figure 16 : Exemple de coloration au Hoechst 33258 d'hépatocytes de souris en culture primaire.	44
Figure 17 : Pourcentage de résistance à l'apoptose chez les lignées Huh7, 9-13, et Tx.	48
Figure 18 : Pourcentage d'apoptose en fonction de la présence d'étoposide 200µM, de la concentration du collagène et du type cellulaire.	50
Figure 19 : Effet de la densité de collagène sur l'activité de ERK-1.	52
Figure 20 : Immuno-buvarpage révélant l'activation des ERK-MAPK (Phospho-MAPK).	53
Figure 21 : Activités enregistrées des AST et ALT selon le type d'hépatopathie.	56
Figure 22 : Ratio AS/LT enregistrés selon le type d'hépatopathie.	56
Figure 23 : Activités AST et ALT dans des biopsies à différents degrés de fibrose.	58
Figure 24 : Ratios AST/ALT de biopsies de foies à différents degrés de fibrose.	58
Figure 25 : Modulations des AST et ALT dans les hépatocytes humains infectés ou non par le VHC à partir d'un million d'hépatocytes vivants.	60
Figure 26 : Comparaison des ratios AST/ALT dans les hépatocytes humains isolés selon s'ils sont ou non infectés par le VHC.	60
Figure 27 : Activité AST et ALT dans des homogénats de foies murins.	61

Liste des figures

- Figure 28 : Comparaison des ratios AST/ALT chez les souris ayant subi un traitement fibrogénique ou non.* _____ 62
- Figure 29 : Variations des concentrations de l'alanine (Ala) et le l'aspartate (Asp) intra-hépatocytaires entre culots d'hépatocytes isolés provenant de foies normaux.* _____ 64

Dédicace

À mon amour

Remerciements

Mes remerciements s'adressent avant tout à mes amis, ma famille, et Mathilde, ma femme, pour m'avoir encouragé, supporté (dans les deux sens du terme) et enduré tout au long de ces deux années. Ce fut dur, mais victoire sans bataille est victoire sans gloire.

Ils s'adressent aussi à l'équipe du BiloLabo, (Val, Suba, mais aussi Tom, Sven, Michaela, et Claudia), qui m'a supporté tant bien que mal, mais qui m'a surtout beaucoup aidé, conseillé, motivé, et appris énormément de choses, le tout dans une ambiance à la fois rigoureuse mais détendue. À vous, je vous adresse un très grand merci.

Ils s'adressent enfin et surtout à mon cher « patron », Marc Bilodeau, pour m'avoir fait confiance alors que rien ne l'obligeait, pour m'avoir guidé et orienté aussi, pour m'avoir permis de découvrir les congrès, et toutes ces choses qui font la valeur d'un labo, et que je n'aurai probablement jamais pu découvrir ailleurs. Il s'est avéré être le directeur de recherche le plus extraordinaire que j'ai jusqu'alors connu.

À vous tous, je vous serai toujours reconnaissant, pour avoir passé deux extraordinaires années, avec ses joies et ses pleurs, mais avec surtout plein de bonheur et d'enseignement.

Amicalement,

Merci

I. Introduction

A. Le foie normal et pathologique

Le foie est un viscère abdominal, logé chez l'homme dans l'hypocondre droit et qui assure trois fonctions vitales : immunitaire, métabolique (hormone, détoxification et drogues), et digestif (bile). C'est le plus volumineux des viscères humains (2 pour cent du poids corporel, soit une moyenne de 1 500 grammes) et l'organe du corps humain qui effectue le plus grand nombre de transformations biochimiques.

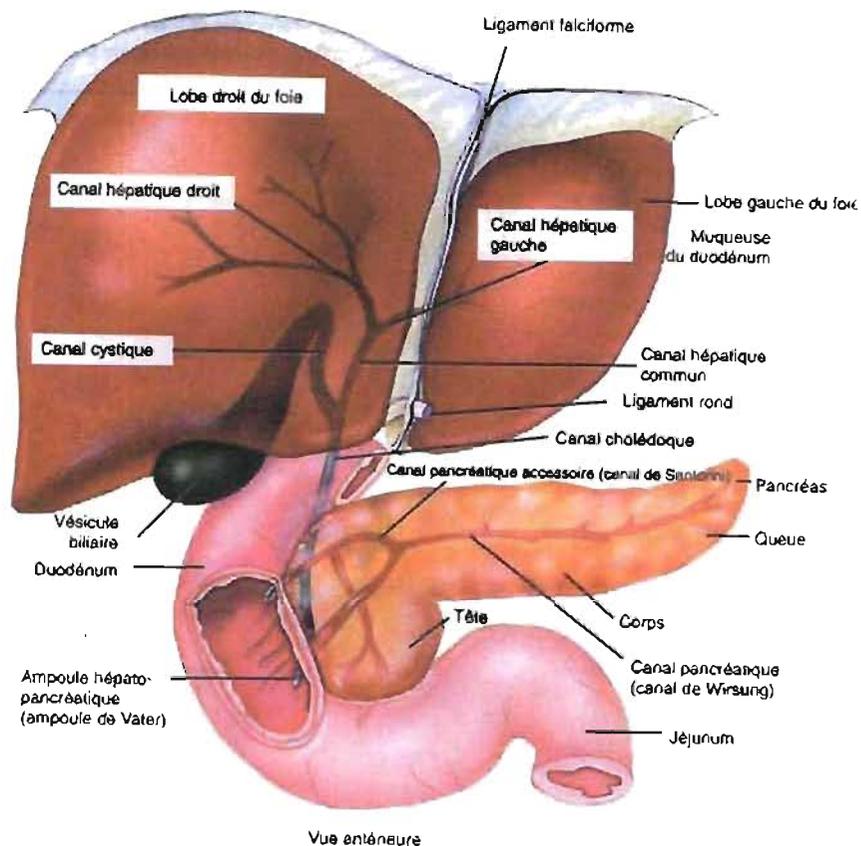


Figure 1: Aspect du tractus gastro-intestinal

(Source : <http://bio.m2osw.com/gcartable/appareildigestif.jpg>)

1. L'état normal du foie

a) Description anatomique, fonctionnelle et histologique

Le foie est formé de deux lobes, droit et gauche, séparé par le ligament falciforme (Figure 1). Le foie est un organe qui reçoit une double vascularisation. La veine porte, formée de l'union de la veine splénique et de la veine mésentérique supérieure, amène 75 à 80 % du flux sanguin hépatique, flux étant passé au préalable par les tractus gastro-intestinal et splénique. Le reste (20 à 25%, soit 350 mL/min) est acheminé par l'artère hépatique, et fourni l'oxygène au foie. Ces deux flux se mélangent dans les sinusoides hépatiques, qui sont les espaces vasculaires définis par les endothéliums fenestrés, puis sont ensuite évacués vers la veine hépatique^{1,2}.

Sur le plan fonctionnel, le foie est aussi divisé en huit segments qui correspondent à la distribution des veines portes et artères hépatiques où chaque segment reçoit un embranchement de la veine porte.

L'unité de base de la structure du foie est le lobule (Figures 2 et 3), unité polyédrique d'un diamètre d'environ 0,25 mm, dont chaque angle est occupé par un espace porte relié à une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et un ou deux canaux biliaires.

Les hépatocytes sont disposés en rangées d'une cellule d'épaisseur qui délimitent les sinusoides à l'intérieur desquels se fait la circulation sanguine. Ces sinusoides sont poreux et laissent passer les nutriments destinés aux hépatocytes, ainsi que de nombreuses autres molécules et métabolites.

L'espace compris entre les cellules endothéliales des sinusoides et les hépatocytes est désigné sous le nom d'« espace de Disse ». On y retrouve quelques rares cellules étoilées (cellules de Ito, ou encore cellules hépatiques étoilées (CHE)) dont le cytoplasme contient des vacuoles lipidiques riches en vitamine A et enfin, en très faible quantité, une

matrice extra-cellulaire (MEC)³ composée d'une grande variété de protéines. C'est dans cet espace que se déroule la majorité des échanges entre les hépatocytes et leur environnement.

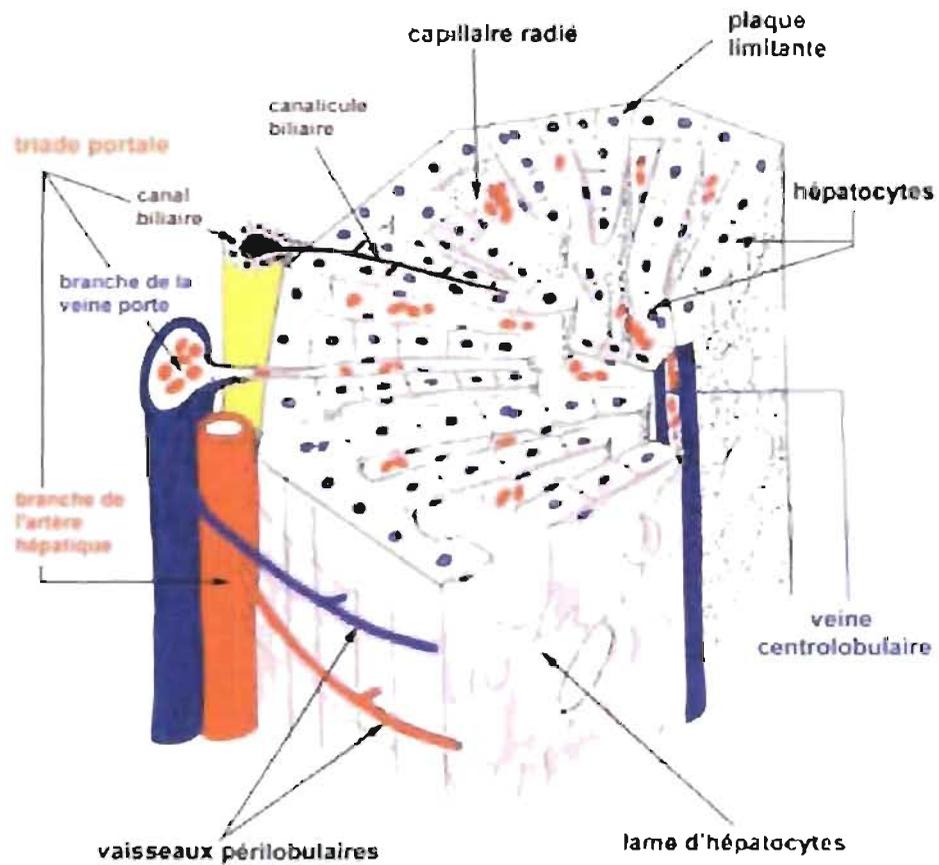


Figure 2 : Schéma représentant la structure d'un lobule hépatique
(<http://www-c.inria.fr/who/Marc.Thiriet/Glosr/Bio/Foie/HistoFoie.html>)

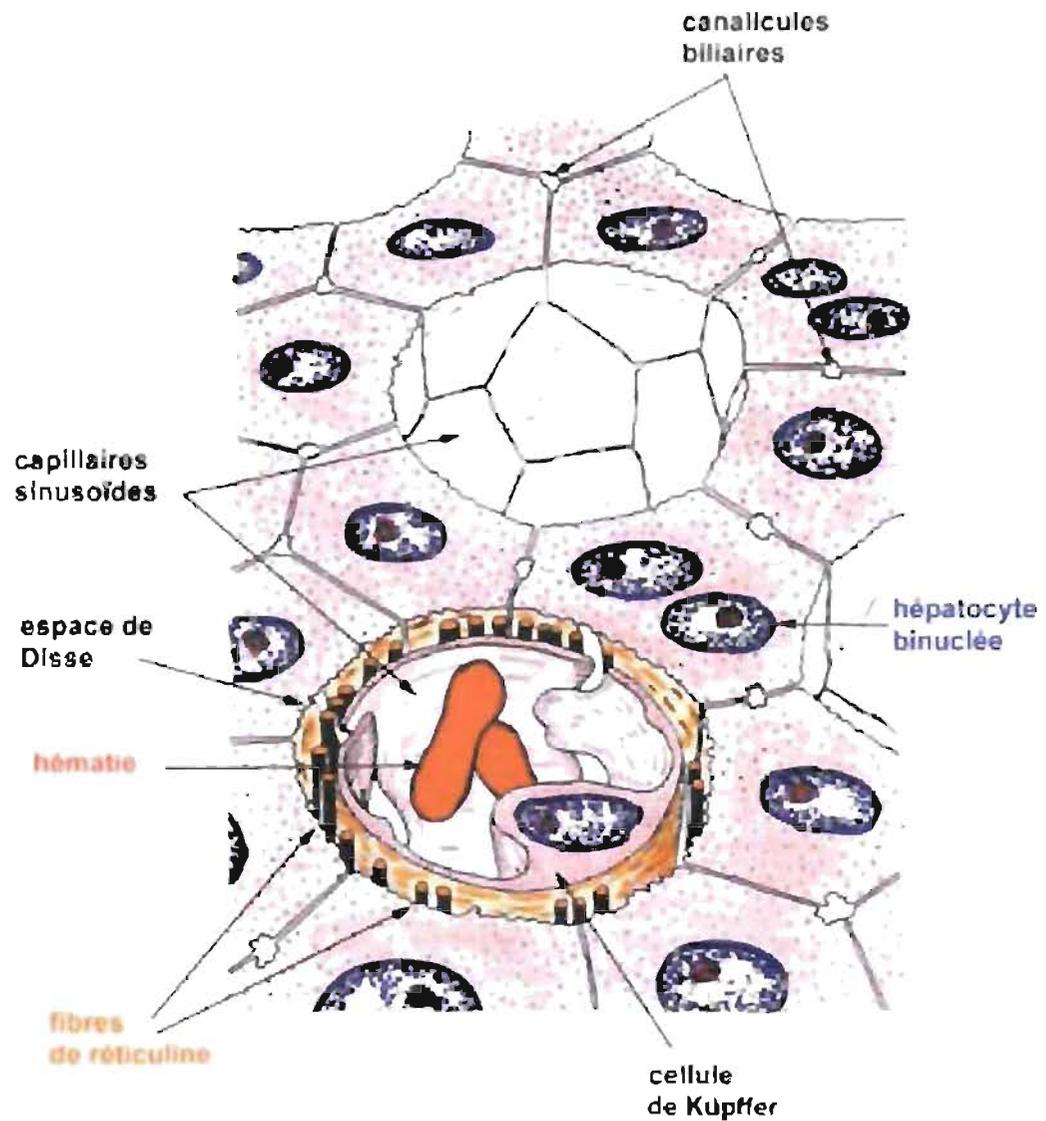


Figure 3 : Les capillaires hépatiques et leurs structures adjacentes.

(<http://www-c.inria.fr/who/Marc.Thirie/Glosr/Bio/Foie/HistoFoie.html>)

On y retrouve aussi des macrophages tissulaires accrochés à la face luminale des cellules endothéliales (cellules de Kupffer).

b) Les cellules hépatiques et leur environnement

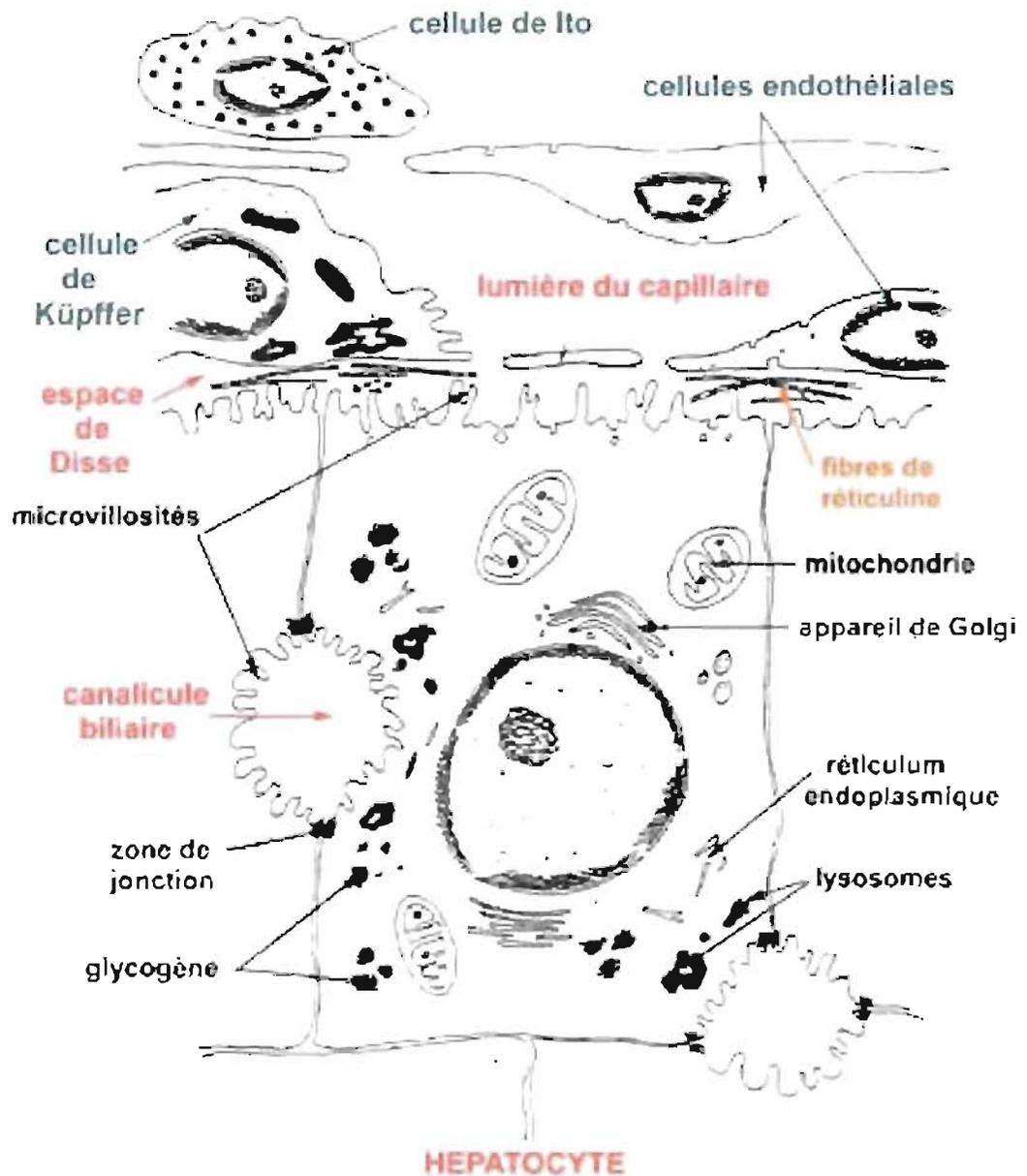


Figure 4 : L'hépatocyte et son environnement cellulaire direct.

(<http://www-c.inria.fr/who/Marc.Thiriet/Glosr/Bio/Foie/HistoFoie.html>)

(1) Les hépatocytes

Environ 100 milliards d'hépatocytes composent le foie et occupent 80% du volume de ce dernier. Elles représentent de 60 à 80% des cellules hépatiques. Il s'agit de cellules polyédriques de 20 à 40 μm de diamètre chez l'humain, dont les surfaces sont en rapport soit avec l'espace de Disse (et les sinusoides sous-jacents), soit avec un canalicule (pôle biliaire), soit avec un autre hépatocyte au moyen de jonctions intercellulaires. La membrane hépatocytaire présente de nombreuses villosités aux pôles biliaire et vasculaire de la cellule, mais n'est que rarement en contact avec la MEC.

Le cytoplasme des hépatocytes contient les différents organites que l'on retrouve dans une cellule normale, avec les quelques petites particularités suivantes : on retrouve ainsi un important réticulum endoplasmique granulaire (REG) qui reflète une abondante synthèse protéique, ainsi qu'un imposant réticulum endoplasmique lisse (REL) qui contient les enzymes de détoxification (comme le cytochrome P450) et de conjugaison, qui jouent un rôle important dans le métabolisme des médicaments¹. Par ailleurs, de nombreux grains de glycogène intra-cytoplasmiques dénotent une activité relative au stockage d'énergie.

Enfin, même si ce n'est pas leur rôle prépondérant, les hépatocytes peuvent contribuer à la synthèse de protéines impliquées dans la composition de la matrice qui leur est sous-jacente, en produisant de la fibronectine et certains types de collagène⁴. Il n'en reste pas moins que les cellules affectées à l'essentiel de la synthèse et du remodelage de cette matrice sont les cellules étoilées.

(2) Les cellules de Küpffer

Les cellules de Küpffer ont pour principale fonction la phagocytose de particules étrangères, virus et bactéries inclus. De plus, elles contribuent à l'élimination d'endotoxines et autres substances nocives, ainsi qu'à la modulation de la réponse immunitaire par la libération de médiateurs. Elles sont aussi activables par des cytokines, l'acide nitrique et les formes actives de l'oxygène. Elles représentent, à elles seules, 80 à 90% des macrophages tissulaires présents dans le corps⁵.

(3) Les cellules étoilées

Les cellules étoilées ont un rôle dans le stockage de la vitamine A⁶ (rétinoïdes) et dans la synthèse et le renouvellement de la matrice du foie^{7, 8}. Elles représentent, en temps normal, environ 10 à 15% de l'ensemble des cellules hépatiques⁹.

Lors d'insultes hépatiques chroniques, elles ont la capacité de se différencier en myofibroblastes en réaction aux lésions hépatiques. Elles initient alors une voie de synthèse particulière qui aboutira à un dépôt et une accumulation de MEC¹⁰ ayant subi quelques modifications dans sa composition protéique.

(4) Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sinusoidales ont des caractéristiques propres qui font qu'elles diffèrent sensiblement des autres cellules épithéliales. En effet, outre l'absence de membrane basale, ces cellules présentent une fenestration très abondante, essentielle aux échanges moléculaires entre l'espace de Diss et le compartiment sanguin. Par ailleurs, cette absence de membrane basale facilite la circulation des lymphocytes, qui peuvent alors directement entrer en contact avec les hépatocytes. Enfin, les cellules endothéliales, par les messagers chimiques qu'elles peuvent relarguer dans la lumière des vaisseaux sanguins, contrôlent la relaxation ou la constriction des cellules étoilées hépatiques.²

(5) Les lymphocytes hépatiques

Les lymphocytes hépatiques sont éparpillés au sein du parenchyme hépatique. Un foie humain normal contient environ 10^{10} lymphocytes, répartis en deux sous-populations distinctes : les lymphocytes conventionnels, c'est-à-dire les cellules NK (Natural Killer) et NKT (T Natural Killer) qui s'occupent du système immunitaire inné; et les lymphocytes non conventionnels (Lymphocytes B et T), gérant de leur côté le système immunitaire adaptatif¹¹.

c) Fonctions hépatiques

(1) Le métabolisme hépatique

Le métabolisme du foie est essentiellement axé sur les glucides, les protéines et les lipides. La glycémie de l'organisme est stabilisée par le foie qui emmagasine le glucose sous forme de glycogène (glycogénèse) mais qui peut aussi le restituer au besoin (glycogénolyse).

Par ailleurs, le foie est aussi capable de synthétiser des glucides à partir d'acides aminés, ou au besoin, de lipides¹; joue un rôle dans la tolérance immunitaire (Lymphocytes hépatiques et cellules de Küpffer), la synthèse de facteurs coagulants (Fibrinogène), et assure l'homostasie du fer, du cuivre, la synthèse et la distribution d'hormones et de vitamines (A, B12), ainsi que la production de la bile.

(a) Métabolisme des acides aminés

Le foie est responsable de la synthèse et de la dégradation des acides aminés. La majeure partie des protéines circulant dans le plasma y est aussi synthétisée (comme l'albumine, qui représente 40% des protéines sériques et la plupart des globulines). Le catabolisme des acides aminés fait appel à des amino-transférases. L'effet des réactions de transamination est de collecter, sous forme de L-glutamate, les groupements aminés de différents acides aminés. Le L-glutamate est ensuite désaminé et le groupement amine, qui devient alors un ion ammoniacque, peut alors s'orienter vers la voie du cycle de l'urée. Le squelette carboné restant, quant à lui, est transformé en acétylCoA ou rejoint les différents intermédiaires du cycle de Krebs.

(b) Cycle de l'urée

Le foie est aussi le siège du cycle de l'urée, ou cycle de l'ornithine, essentiel dans l'élimination de l'azote produit pendant le catabolisme des acides aminés. En effet, l'azote, toxique sous la forme de l'ion ammonium, ne peut être stocké par l'organisme, et doit être utilisé ou éliminé. Ce cycle prend essentiellement place dans les hépatocytes périportaux.

(2) La détoxification

Les hépatocytes sont dotés d'enzymes ayant un rôle actif dans la détoxification. Ces enzymes, telles le cytochrome P450, capables de métaboliser un large spectre de xénobiotiques¹² (molécules non synthétisées par l'organisme) font du foie l'organe destiné à l'élimination de la plupart des molécules toxiques à l'organisme. Cette fonction de détoxification essentielle met aussi le foie en première ligne face à des toxiques non métabolisables, dont la concentration est trop élevée ou encore qui revêtent un caractère chronique (alcoolisme par exemple). D'autres voies de détoxification, comme la glucuronidation, aident à la fixation chimique d'acide glucuronique. Cette réaction favorise la solubilisation de substances faiblement solubles dans l'eau, et permet l'excrétion d'un large éventail de drogues, médicaments, polluants, et autres molécules.

d) La matrice extracellulaire normale

À l'état normal, la quantité de MEC au sein du foie est très faible (sauf un peu autour des structures vasculaires et dans les espaces de Disse)^{13,14}. Elle sert essentiellement à soutenir les lames d'hépatocytes¹⁵, ainsi que les structures vasculaires et biliaires. De plus, la MEC maintient la polarisation des hépatocytes et joue, finalement, un rôle prépondérant dans l'organisation structurale et fonctionnelle du foie.

La MEC normale du foie est essentiellement composée de collagènes de type I et III¹⁶ (même si les types IV, V, VI, VIII, XIV, XV, XVIII, et XIX^{7,16,17} sont aussi présents, mais en plus faibles concentrations), de laminine (Types 1 à 7), de fibronectine, de glycoprotéines, de glycosaminoglycane, de fibrinogène et de perlécan^{18,19}. D'autres éléments, en concentrations plus faibles, sont également présents (acide hyaluronique, élastine, ténascine, et thrombospondine²⁰). Elle est renouvelée en permanence grâce aux cellules étoilées, qui assurent un équilibre fragile entre synthèse et dégradation grâce à des enzymes de type métalloprotéinases (responsables de la dégradation de la MEC) et leurs inhibiteurs, les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMP)^{21,22}.

2. Un état pathologique : la fibrose

a) Description

Quand se développe une hépatopathie chronique, celle-ci a souvent pour origine une réponse à un large éventail d'insultes, incluant les hépatites virales (entre autres B et C), l'abus d'alcool, l'utilisation de médicaments hépatotoxiques, les altérations métaboliques diverses incluant une surcharge en fer ou en cuivre, des attaques auto-immunes, ou même des anomalies congénitales.

Alors que progresse l'hépatopathie, la fibrose s'étend au travers des lobules hépatiques, ce qui désorganise progressivement la structure du foie, et diminue ses fonctionnalités en réduisant les échanges de substances solubles (gaz, nutriments, médicaments...) entre les hépatocytes et le compartiment sanguin. Le rôle de l'élimination des toxiques ne se fait plus de façon aussi efficace. Le développement de la fibrose participe aussi à l'apparition d'une hypertension portale en augmentant la résistance intrahépatique¹ du flux sanguin.

Bien que le processus de la fibrose soit lent et asymptomatique (les premiers symptômes peuvent survenir parfois 15 à 20 ans après les premières lésions du foie, souvent au stade de cirrhose à ce moment. Ceux-ci s'apparentent alors à une jaunisse due à l'accumulation de bilirubine. la fatigue, la perte d'appétit, des nausées, de la fièvre, une faiblesse générale et des douleurs abdominales), il n'en reste pas moins qu'il s'agit aussi d'un processus réversible²³⁻²⁵ tant que le stade de cirrhose n'est pas atteint (Figure 5).

Les cellules responsables de l'apparition et de la progression de la fibrose dans le foie sont les cellules étoilées^{10, 26, 27}. Lors d'une insulte hépatique à développement chronique, ces cellules se différencient²⁸ selon un processus double : initiation et continuation / prolifération²⁹.

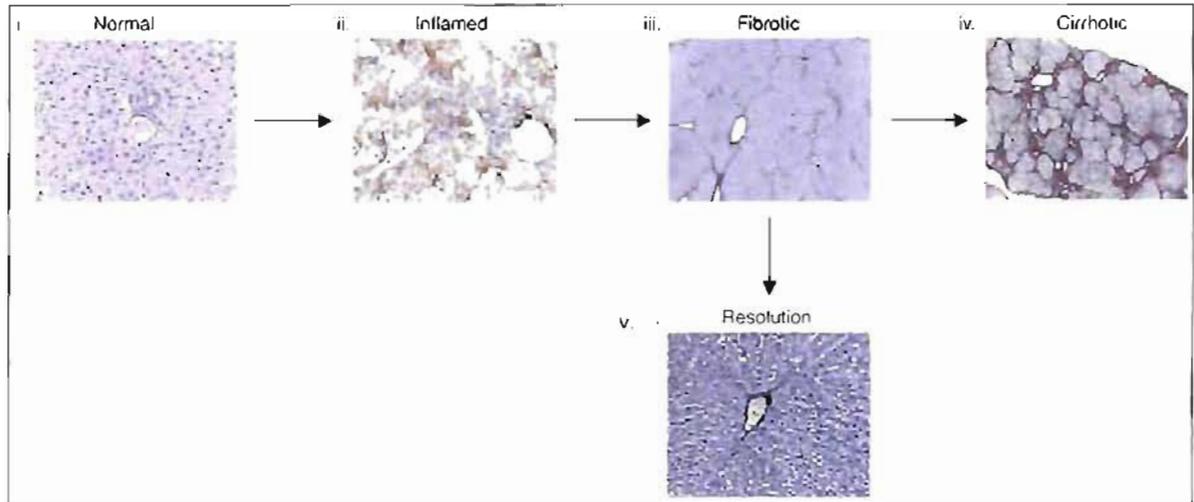


Figure 5 : Coupes histologiques de foies atteints de différents degrés de fibrose. Les dommages induits au foie normal (I) conduisent à l'inflammation et l'activation des cellules hépatiques étoilées (Marquage en maron avec un Ac anti α -SMA(Smooth Muscle Actine pour Actine de Muscle Lisse de type α))(II) qui lancent alors les processus de dédifférenciation et de synthèse de collagène (III)³⁰. Deux possibilités sont alors envisageables : si l'insulte se poursuit, le développement d'une cirrhose (IV), alors que si l'insulte s'arrête, le retour à une situation presque identique au stade normal (V). (Coloration à l'Hématoxyline Phloxine-Safran (HPS)).

Premièrement, l'initiation implique des changements dans l'expression génique et le phénotype. Le signal initiateur est l'apparition de molécules lipidiques peroxydées issues des hépatocytes et des cellules de Kupffer endommagées³¹. Le stress oxydatif résultant est un des activateurs de la synthèse de collagène de type I³²⁻³⁵. Il s'agit du début d'une réponse cellulaire en cascade. D'autres facteurs, comme le facteur transformant de croissance β (Transforming growth factor – β : TGF- β)³⁶⁻³⁹ provenant du site de l'inflammation et relargué par les hépatocytes, activent la transformation des cellules étoilées en myofibroblastes. Enfin, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet Derived Growth Factor : PDGF) est un facteur mitogénique permettant la prolifération des cellules étoilées, activant un ensemble de molécules signalisatrices comme le phosphatidylinositol 3 phosphate (PIP3) et la voie sous-jacente de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K), la cascade Ras/Raf et la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (Mitogen activating protein kinase : MAPK).

Par la suite, la continuation/prolifération implique quant à elle une régulation tant paracrine qu'autocrine, qui va directement induire la prolifération cellulaire, la fibrogenèse, la contractilité, le relargage de cytokines et le développement d'un chimiotactisme attractif des cellules du système immunitaire^{30, 36, 40}.

Le processus d'activation et de perpétuation est schématisé dans son ensemble à la Figure 6 ci-dessous, et est montré de façon plus ciblée sur la cellule étoilée à la Figure 7.

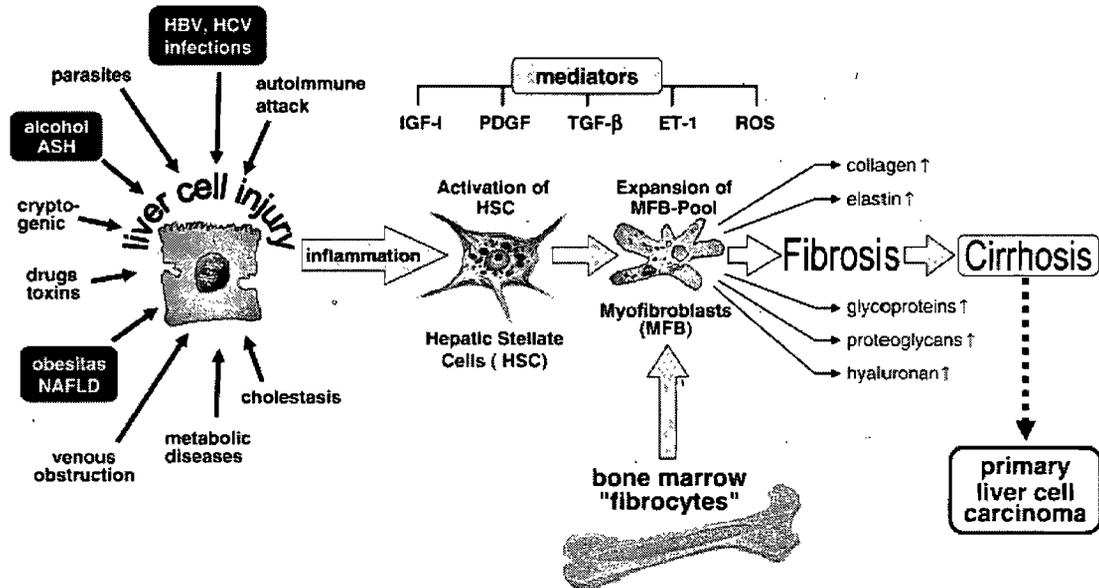


Figure 6 : Séquence pathogénique de l'activation des cellules hépatiques étoilées et de l'accumulation de la MEC⁴¹.

Ainsi, en se différenciant, les cellules étoilées développent un phénotype de myofibroblaste. Ces myofibroblastes sont des cellules présentant une plasticité et une activité métabolique avec des caractéristiques propres de prolifération, de fibrogenèse et de contractilité³⁶. Elles perdent en partie leur capacité à dégrader la MEC et acquièrent un cytosquelette propre à leur nouveau phénotype : celui-ci est caractérisé par une forte expression de l' α -SMA⁴². Ces cellules migrent sur le site de lésion par chimiotactisme et initient un processus de prolifération grâce à un système de synthèse de facteurs de croissance autocrines qui amplifient leur croissance⁴³.

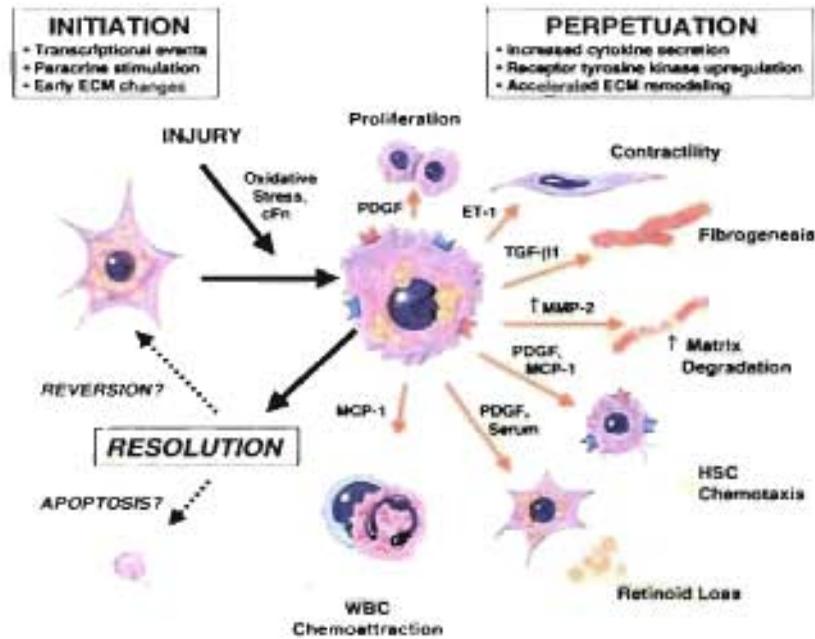


Figure 7 : Répertoire des activités possibles des cellules hépatiques étoilées activées.

Le mécanisme d'accumulation de la MEC met en cause les trois points suivants :

- La synthèse des TIMP est dérégulée : les myofibroblastes se retrouvent dans l'incapacité d'éliminer les composants de la MEC.
- La demi-vie des ARNm du collagène type I est augmentée^{44, 45} par une modification de la structure de la boucle 5' de ces ARNm, ce qui favorise non seulement sa synthèse, mais augmente aussi de façon importante la durée de vie de l'ARNm, et finalement, l'accumulation de la protéine.
- La surexpression de l'enzyme cytochrome P4502E1 (enzyme de détoxification qui génère des intermédiaires oxydatifs puissants) entraînerait une stimulation de l'expression du gène du collagène de type I⁴.

Ces processus vont ainsi promouvoir la néosynthèse, l'accumulation et le dépôt de MEC en rompant l'équilibre entre synthèse et dégradation. Dans les stades avancés, un foie fibrotique contient environ 3 à 6 fois plus de MEC que dans un foie normal.

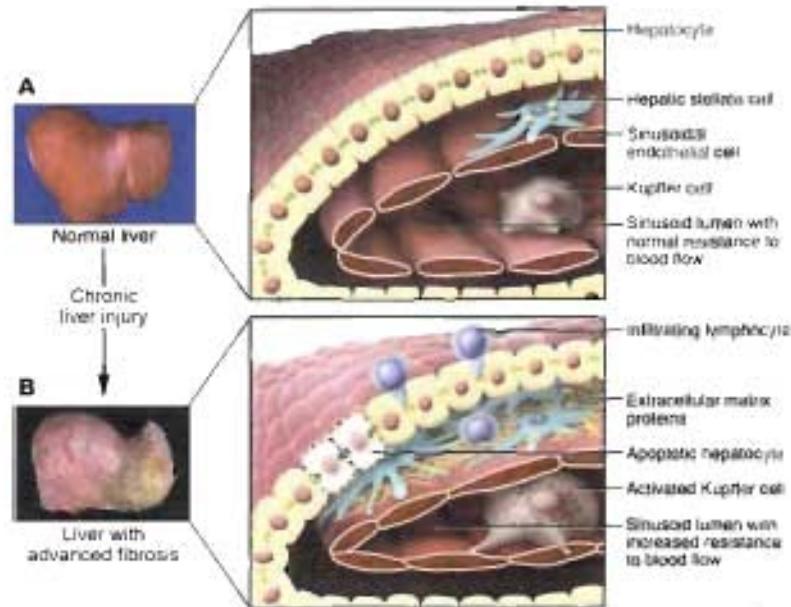


Figure 8 : Évolution d'un foie normal vers la fibrose ⁴¹

b) La progression de la fibrose

La fibrose hépatique est caractérisée par une synthèse, un dépôt, et une accumulation d'une MEC riche en collagènes fibrillaires, essentiellement constituée de collagène de type I. Elle s'étend progressivement à partir des zones lésées, formant de larges bandes qui se répandent à travers le lobule, pour finalement se rejoindre, isolant des nodules d'hépatocytes (stade de cirrhose). La fibrose se dépose également dans l'espace périsinguosoïdal de façon précoce, où elle entre en contact avec les cellules environnantes et modifie leur phénotype, ce qui a pour conséquence une perte des fenestrations des cellules endothéliales sinusoidales ainsi qu'une disparition des microvillosités hépatocytaires. L'accumulation de MEC et les modifications cellulaires qui en résultent réduisent les échanges de substances solubles entre le compartiment sanguin et les hépatocytes, concourant au développement d'une insuffisance hépatique. Elle participe également au développement de l'hypertension portale en augmentant la résistance intra-hépatique du fait des modifications anatomiques locales.

c) Score de Ishak

Le stade de fibrose atteint par le foie d'un patient peut être évalué en réalisant une biopsie. Une classification, réalisée par Ishak *et al.*⁴⁶, révèle 7 différents degrés, notés F0 (absence de fibrose) à F6 (stade de cirrhose) qui permettent d'évaluer le stade de fibrose hépatique (Tableau I). Cette évaluation, qui fait suite à une coloration des fibres de collagène, est subjective, semi-quantitative, et requiert l'expertise d'un pathologiste.

Tableau I : Évaluation de la fibrose par score de Ishak (Traduction libre)⁴⁶.

Changement architectural	Score
Pas de fibrose	0
Expansion fibreuse dans certaines zones portales, avec ou sans courts septa fibreux	1
Expansion fibreuse dans la plupart des zones portales, avec ou sans courts septa fibreux	2
Expansion fibreuse dans la plupart des zones portales, avec ponts occasionnels entre zones portales	3
Expansions fibreuses des zones portales, avec ponts fréquents entre zones portales ou zone portale à zone centrale	4
Ponts fréquents (entre zones portales et/ou de zones portales à zone centrales) avec nodule occasionnels (cirrhose incomplète)	5
Cirrhose complète et définitive	6

d) La cirrhose et ses implications cliniques

C'est le stade ultime du développement de la fibrose (Figure 9B). À long terme, elle est la conséquence de pratiquement toutes les insultes chroniques du foie. Les hépatocytes détruits sont progressivement remplacés par la MEC (qui s'apparente alors à du tissu cicatriciel) alors que ceux restants n'arrivent plus à recomposer de lobules fonctionnels du fait de l'accumulation de fibrose. Pour compenser la destruction des hépatocytes, il se produit une régénération des hépatocytes restants, qui aboutit à la formation de nodules de régénération. À ce stade, toute structure lobulaire est perdue, la fonction hépatique est à son plus faible niveau et les risques inhérents à une hypertension portale ainsi qu'au développement d'un hépatocarcinome sont majeurs. Il n'existe dès lors plus de possibilité

de guérison et une transplantation s'avère alors nécessaire. Les deux principales lésions de la cirrhose sont la fibrose et les nodules de régénération, même si d'autres atteintes cellulaires peuvent coexister (comme une stéatose par exemple).

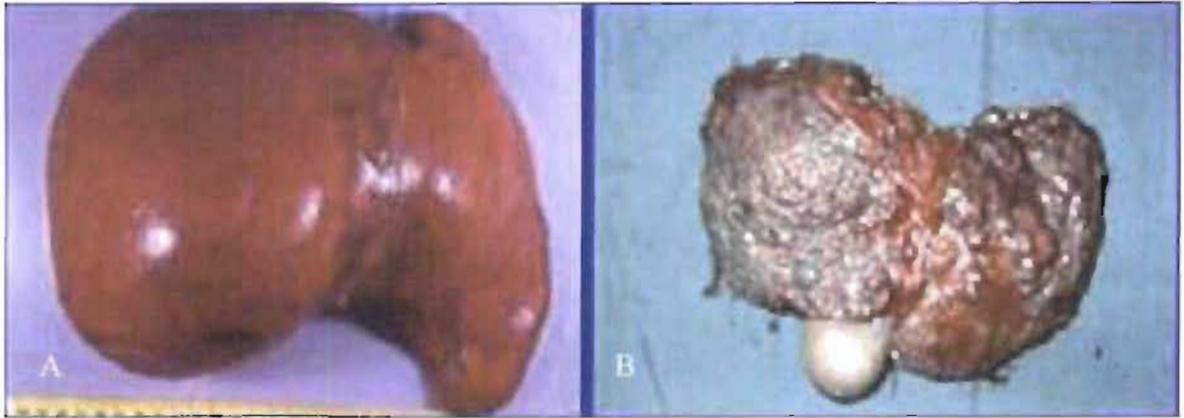


Figure 9 : Comparaison entre un foie sain et un foie cirrhotique. (Source : http://www.canalu.fr/canalu/img/10/img_1379233510.jpg) A) Foie sain, B) Foie cirrhotique.

3. Les principales protéines hépatiques utilisées pour mesurer les atteintes hépatiques.

Du fait de la dégradation du parenchyme hépatique et de la mortalité subséquente des hépatocytes due à l'inflammation, la rupture des membranes cellulaires entraîne le relargage de certaines enzymes hépatiques dans le compartiment sanguin. Ces enzymes, de part leur origine, sont utilisées comme les marqueurs les plus à même de révéler la présence et l'intensité de l'atteinte cellulaire hépatique. Ainsi, certaines amino-transférases, et même d'autres protéines, voient leurs concentrations et/ou leurs activités modulées par une atteinte hépatique.

a) Les aminotransférases

L'AST (E.C. 2.6.1.1., gène GOT 1 cytosolique et GOT2 mitochondrial) et l'ALT (E.C. 2.6.1.2., gène GPT1) sont des transaminases (ou aminotransférases). Ces enzymes

sont normalement localisées au sein du cytoplasme ou des mitochondries des hépatocytes où elles contribuent fortement au métabolisme des acides aminés.

Cependant, bien que leur présence dans le sérum soit généralement mesurée à une concentration inférieure à 50 U/L (ALT) et 45 U/L (AST), des situations d'hépatopathies permettent d'observer de fortes augmentations de la présence de ces enzymes dans le sérum.

Les transaminases ont la propriété de catalyser un type de réaction mettant en jeu un acide aminé et un acide de type α -céto. La transamination est une réaction réversible, où un groupement 'amine' est enlevé d'un acide aminé pour être transféré vers un α -céto acide qui est alors transformé en acide aminé (réaction de type « ping-pong »). Cette réaction est très courante dans le cadre du catabolisme des acides aminés. La libération de ces enzymes dans le sérum permet de pronostiquer l'évolution de pathologies touchant la plupart du temps le foie.

Cependant, quand le foie, et plus précisément les hépatocytes, sont confrontés à une insulte, les concentrations sériques de ces enzymes sont sujettes à de fortes fluctuations, essentiellement dues à l'altération des membranes hépatocytaires, ce qui permet de pronostiquer l'étendue et la sévérité de l'insulte.

(1) ASpartate aminoTransférase (AST)

L'AST catalyse, avec son co-enzyme, le pyridoxal-5' phosphate (Vitamine B6), le transfert d'un groupement amine alpha depuis un acide aspartique sur un groupement alpha cétonique de l'acide céto glutarique pour produire de l'acide glutamique (Figure 10 et Figure 11).

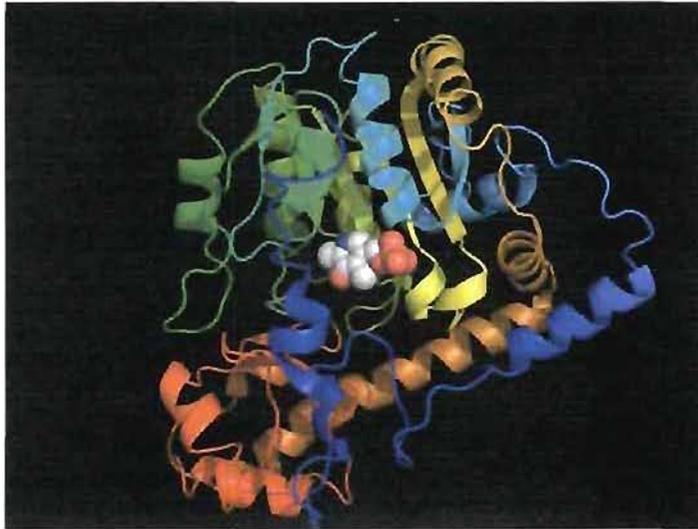


Figure 10 : Représentation de l'AST. On distingue, au milieu, le co-enzyme pyridoxal phosphate, destiné à catalyser la réaction de transamination.

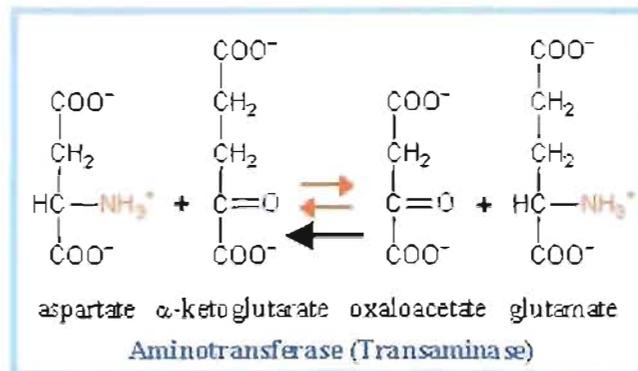


Figure 11 : Représentation de la réaction catalysée par l'aspartate aminotransférase. La réaction est très orientée vers la synthèse de l'aspartate ($K_m = 2,06 \text{ mM}$ vs. $22,5$ dans l'autre sens)

(2) ALanine aminoTransférase (ALT)

L'ALT, qui est aussi une enzyme nécessitant comme co-enzyme la vitamine B6, réalise une réaction assez similaire à celle de l'AST, qui permet la synthèse de l'alanine et de l' α -cétoglutarate à partir de pyruvate et de glutamate (Figure 12) :

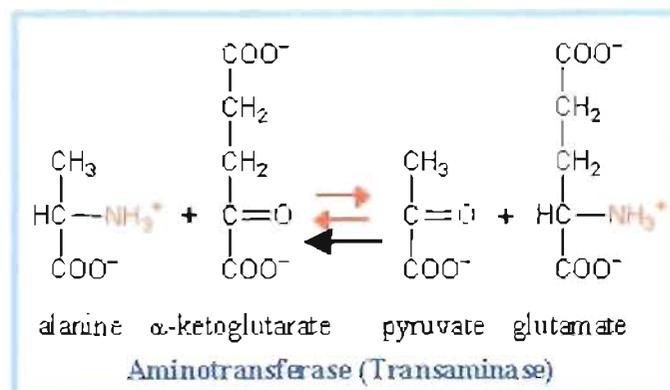


Figure 12 : Équation de la réaction catalysée par l'ALT. La réaction est ici très orientée vers la synthèse de l'alanine ($K_m = 5,1 \text{ mM}$ vs. 21 dans l'autre sens)

b) Autres enzymes et protéines

(1) Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (PAL) (N° EC 3.1.3.1) existe sous quatre isoformes exprimées dans différents tissus chez les organismes supérieurs. Il s'agit d'une enzyme hydrolytique dont la fonction est de détacher les groupements phosphates situés en position 5' et 3' de différents types de molécules telles que les nucléotides, les protéines et les alcaloïdes. La PAL hépatique voit sa concentration s'élever lorsque se présentent des obstacles à l'élimination de la bile (jaunisse ou icère), en particulier par calculs (lithiase), tumeurs de la vésicule et des voies biliaires ou du pancréas, ainsi qu'au cours des hépatites et des cancers du foie. L'augmentation des phosphatases alcalines peut aussi être due à des affections osseuses¹.

(2) Gamma glutamyl transpeptidase

La gamma glutamyl transpeptidase (GGT ou GGTP, ou Gamma-GT ou γ -GT, etc.) (N° EC 2.3.2.2) est une enzyme hépatique, principalement produite par les hépatocytes, dont la mesure de l'activité dans le sérum des patients permet d'indiquer (si cette activité est élevée) une anomalie du foie, sans pour autant donner plus de précisions. Cette enzyme, qui est synthétisée par le foie, voit sa concentration augmenter en cas de fibrose, d'alcoolisme chronique, et dans le cas de stéatoses due à un excès pondéral¹.

(3) *L'alpha2 macroglobuline (A2M)*

Fabriquée par le foie, la concentration sérique de A2M augmente avec la fibrose et l'inflammation. Sa fonction est d'inhiber des protéases⁴⁷. Elle est produite en excès lors de l'inflammation du foie et de la formation de la fibrose. L'A2M réduit la synthèse de MEC régulée de façon para- et autocrine par les cellules étoilées⁴⁸. Ces dernières sont une source potentielle d'A2M, dont l'expression inhibe le remodelage de la MEC pendant le processus fibrogénique⁴⁹.

4. Les marqueurs de la fibrose du foie

La littérature nous rapporte de nombreuses méthodes (Élastographie, biopsie, enzymes sériques) pour quantifier la fibrose hépatique⁵⁰.

a) Biopsie

La ponction-biopsie consiste à retirer un cylindre de parenchyme hépatique au moyen d'une aiguille spéciale par la voie transpariétale, entre le 8^e et la 9^e espace intercostal¹. Il est possible de la réaliser pendant une intervention chirurgicale.

(1) Évaluation morphologique

La technique du pointage d'Ishak⁵¹, qui est une analyse morphologique permettant d'évaluer l'étendue de la fibrose, est utilisée comme outil diagnostique à partir d'une biopsie hépatique chez l'humain. Une coloration HPS des fibres de collagène localisées entre les rangées d'hépatocytes permet évaluer l'ampleur de la fibrose. D'autres colorations, comme la coloration au rouge Sirius, ou la méthode du trichrome de Masson, peuvent aussi colorer les fibres de collagène et permettre une évaluation du degré de fibrose.

Il faut cependant noter qu'une biopsie peut sous-estimer (ou sur-estimer) la fibrose détectée.

(2) *Évaluation biochimique (dosage d'hydroxyproline)*

Le dosage d'hydroxyproline est une mesure quantitative du collagène dans un échantillon. L'ajout du groupement hydroxyle sur certains résidus de proline est caractéristique de la composition du collagène, et essentiel à sa conformation en triple hélice⁵². Le dosage de la concentration de l'hydroxyproline du foie est donc une mesure quasi-directe de la fibrose hépatique.

b) Des marqueurs physiologiques : les enzymes hépatiques

La ponction biopsie hépatique a longtemps été le test standard pour évaluer l'état du foie du patient. Cependant, son caractère invasif, sa morbidité et sa mortalité non négligeables, ainsi que les erreurs possibles d'évaluation liées à la répartition irrégulière de la fibrose ont été les principaux arguments pour le développement de méthodes non invasives d'évaluation de la fibrose hépatique. Ainsi, des techniques indirectes de détection de la fibrose hépatique ont été mises au point en effectuant des corrélations entre des concentrations de marqueurs sériques et les observations provenant de biopsies hépatiques.

Cependant, aucune méthode ne semble parfaite, souvent à cause d'une spécificité ou d'une sensibilité trop faible⁵³⁻⁵⁶. D'importants progrès ont été réalisés récemment, et la littérature nous rapporte régulièrement de nouvelles techniques.

(1) *Score APRI*

Ce test, mis au point en 2003 par l'équipe de Wai et *Al.*⁵⁷, est une méthode simple permettant d'évaluer le niveau de fibrose de patients présentant un hépatocarcinome. Ce score « APRI » est égal à $AST / (LSN (= \text{multiple de la limite supérieure de la normale}) \times 100 \text{ plaquettes } (10^9/L))$. L'aire sous la courbe ROC (courbe statistique permettant de vérifier l'acuité d'un test pour savoir si celui-ci est capable de discerner au sein d'un groupe les individus malades des individus sains) pour la détection d'une fibrose significative (Ishak \geq F3) est de 0,88, et est pour une cirrhose (Ishak \geq F5) de 0,94. Des valeurs seuils

ont été déterminées pour la fibrose significative ($< 0,50$ et $\geq 1,50$) et pour la cirrhose (≤ 1 et ≥ 2).

(2) FIBROTEST

Ce test commercial⁵⁸ est destiné à remplacer, dans certains cas, la biopsie hépatique. Il s'agit d'un index de fibrose qui combine le dosage dans le sang de 6 marqueurs indirects de fibrose (valeurs normales entre parenthèse) que sont l'A2M (femme : 1,6–4,0 ; homme 1,4–3,3 g/L), Haptoglobine (0,35–2,00 g/L), Apolipoprotéine A1 (1,2–1,7 g/L), Bilirubine totale (5–12 g/L), γ GT (7–32 femme; 11–49 homme), ALT (11–26 femme; 16–35 homme), en réalisant un ajustement selon l'âge et le sexe de la personne. Le FIBROTEST peut fluctuer entre 0 et 1. Pour les scores de fibrose entre 0 et 0,1 la probabilité de fibrose significative est inférieure à 10%. Entre 0,1 et 0,6 la biopsie du foie est généralement conseillée pour estimer plus précisément le stade de fibrose. Pour les scores supérieurs à 0,6, la probabilité de fibrose significative est supérieure à 90%.

(3) FibroMètre

Le FibroMètre est un outil de diagnostic décliné en fonction des contextes pathologiques de la fibrose, permettant un diagnostic selon l'origine virale⁵⁹ (essentiellement hépatites B et C⁶⁰) ou alcoolique de la fibrose.

C'est un test commercial non-invasif de diagnostic de la gravité (degré de fibrose) des maladies du foie faisant appel aux concentrations de différents marqueurs sanguins dans le sérum des patients, c'est-à-dire le taux de plaquettes, le taux de prothrombine, les concentrations d'ALT, d'AST, de bilirubine, de γ GT, d'urée, d'acide hyaluronique et d'A2M. Ils sont réalisés à partir d'une prise de sang où les marqueurs biologiques sont dosés. Leurs résultats sont utilisés pour obtenir les FibroMètres⁶¹, qui renseignent sur l'avancement de la fibrose du patient.

Les FibroMètres évaluent deux aspects différents de la fibrose :

- la présence ou non de la fibrose significative : "le score de fibrose" (test qualitatif),

- le pourcentage de fibrose développée dans le foie : "l'aire de la fibrose" (test quantitatif).

Les diagnostics apportés par les FibroMètre sont assez précis, simples à réaliser, à interpréter et non contraignants. Sa fiabilité de 100% dans le diagnostic de la cirrhose a été évaluée dans deux études indépendantes (Angers et Tours/PACA)^{59, 60}. Quant au FibroMètre quantitatif, il permet de mesurer le pourcentage de fibrose dans le foie grâce à "l'aire de fibrose". Les résultats sont ensuite analysés par un « système expert » dont le but est de détecter les quelques résultats "erronés" et de leur substituer un résultat correct. Seul son prix le met hors de portée d'études laboratoires en série.

(4) *Le ratio AST/ALT (AS/LT)*

Il s'agit d'un des marqueurs les plus cités^{62, 63}, qui doit cependant parfois être complété avec une biopsie^{64, 65} à cause de ses faibles sensibilité et valeur prédictive négative⁶⁶. La raison essentielle de l'utilisation de ce ratio est sa grande spécificité et son faible coût.

Le ratio des AS/LT sériques est utilisé depuis maintenant une cinquantaine d'années afin d'évaluer le degré de fibrose de foie de patient porteurs d'hépatites chroniques ou d'autres pathologies, telle la cirrhose. Il s'avère en effet que la variation de l'AS/LT est relative au degré de fibrose des foies des patients, sans cependant que de réelles corrélations aient été établies.

Cependant, cet index n'est pas d'une fiabilité absolue, mais bien que de nombreux articles paraissent régulièrement proposant de nouvelles méthodes d'évaluation du degré de fibrose^{57, 67-71}, cet index reste un des plus simples à utiliser quand on connaît déjà l'historique du patient ainsi que sa pathologie. Néanmoins, dans la plupart des affections hépatiques, le rapport AS/LT sérique est inférieur à 1, sauf dans le cas de maladie hépatique alcoolique où il est généralement supérieur à 1,5. Ce dernier critère, sans être absolu, peut aider au diagnostic de la lésion alcoolique.

(5) *Autres techniques*

Récemment développée, une variante à l'index AS/ALT, appelée «FIB-4», tenant elle aussi compte et de l'AST et de l'ALT, considère deux variables supplémentaires que sont l'âge et le taux de plaquettes dans le sang⁷². Cette méthode serait plus précise que le ratio AST/ALT pour certain degrés de fibrose, pour un surcoût négligeable.

D'autres études réalisées chez le rat et l'humain démontrent aussi que le degré de fibrose laisse une signature génétique impliquant une modulation dans l'expression de certains gènes, qui pourrait être exploitable pour apposer un diagnostic^{67, 73}. L'une de ces deux études a permis de révéler que l'expression de 39 gènes montre une bonne corrélation ($r > 0.50$) avec la sévérité de la fibrose, dont la plupart sont impliqués dans la signalisation cellulaire et la réponse immunitaire.

c) Une méthode physique : l'élastographie

L'élastographie est une méthode non-invasive s'apparentant à l'échographie, qui permet d'obtenir des images représentant la fermeté de tissus mous pour détecter la présence de fibrose⁷⁴. En effet, la présence de fibrose a pour conséquence de durcir le foie. En se basant sur le principe selon lequel une onde se déplace d'autant plus vite que le milieu dans lequel elle se propage est dur, il est possible, en calculant la vitesse à laquelle se déplace une impulsion sonore, de déterminer quelle est la dureté du foie, et ainsi la quantité de fibrose du foie.

5. Le virus de l'hépatite C (VHC)

L'inflammation induite puis la fibrose conséquente à l'infection du VHC, une guérison efficace dans seulement 40 à 80% des cas selon le génotype viral (Traitement à l'interféron- α et la ribavirine, un analogue nucléotidique), ainsi que l'inefficacité relative des traitements existants, font de ce virus un problème majeur de santé publique. En effet, son trophisme étant orienté vers les hépatocytes, le virus va induire une réponse

inflammatoire du foie, qui va se traduire par le développement progressif de fibrose hépatique.

a) Description générale

Le VHC, qui appartient à la famille des *Flaviviridae*, et au genre spécialement créé pour lui des *Hepacivirus*, est un petit virus enveloppé d'environ 50 à 60 nm de diamètre. Bien que son existence fut suspectée dès 1976⁷⁵, c'est en 1989⁷⁶ que l'ARN du VHC fut pour la première fois isolé et caractérisé. Le virus complet n'a cependant jusqu'à présent jamais été observé de façon directe.

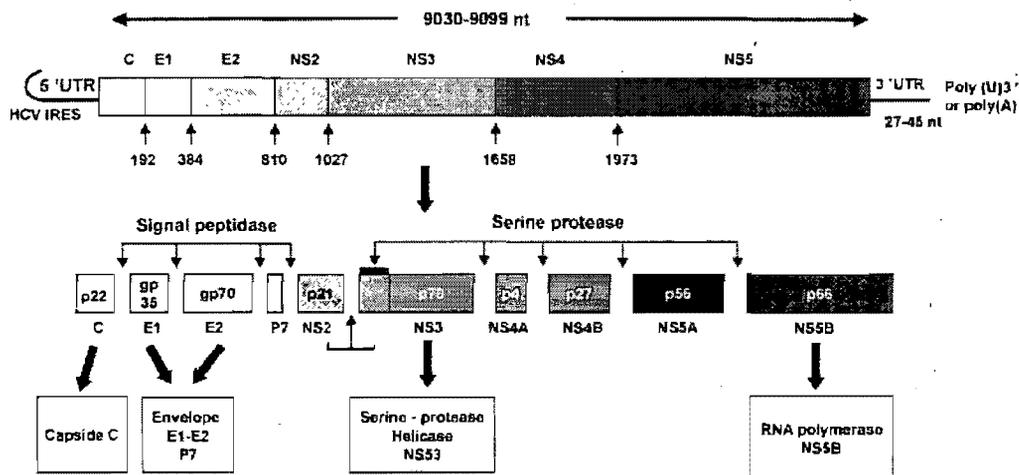


Figure 13 : Organisation du génome du VHC et découpage des protéines virales⁷⁷

Il infecte actuellement entre 170 et 350 millions de personnes (3 à 6% de la population mondiale)^{78, 77}, et est la principale cause d'hépatocarcinome et de cirrhose du foie de par le monde. Classifié en 6 génotypes majeurs (notés de 1 à 6)⁷⁹, ce virus dispose d'un ARN positif simple brin d'environ 9500 bases codant une polyprotéine, qui sera clivée par des enzymes cellulaires et virales en une dizaine de protéines, structurales et non structurales. On distingue (Figure 13) ainsi 3 protéines structurales, appelées C (Core ou Capside), E1 et E2, qui formeront la partie physique du virus ; ainsi que 7 ou 8 protéines

non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, et une autre probable : ARFP), qui ont toutes des rôles plus ou moins bien établis dans la réplication de l'ARN viral et les modifications physiologiques à apporter aux cellules hôtes.

b) Le VHC et les voies de régulation des cellules-hôtes

Ce virus, bien que non cytotoxique, est cependant capable de déréguler, entre autres, toute la voie des ERK-MAP-Kinases inhérente à la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire⁸⁰⁻⁸⁶. Les processus utilisés par le VHC lui permettant d'assurer sa pérennité sont nombreux et complexes, comme la Figure 14⁸⁷ en présente un bref aperçu.

La capside et E2 sont capables d'activer la cascade des Raf/MEK/ERK MAP-Kinases, en augmentant l'activité basale de Raf et MEK et en hyper phosphorylant ERK⁸⁶.
88, 89

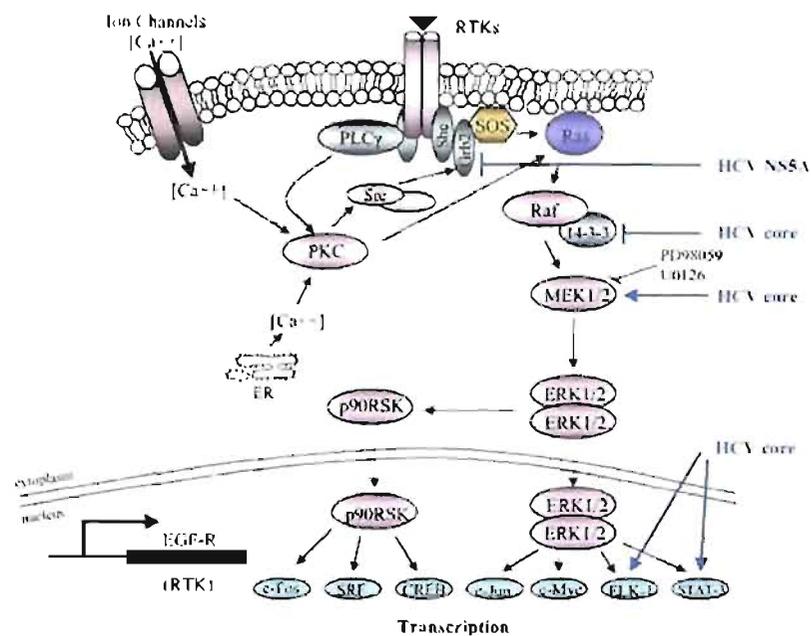


Figure 14 : Aperçu des mécanismes utilisés par le VHC pour activer la voie ERK-MAPK afin de maintenir une croissance cellulaire continue et ainsi, perpétuer l'infection.

En fait, ERK est activée par la capsid, et ce indépendamment des signaux médiés par les facteurs mitogéniques hépatocytaires que sont l'EGF et TGF α , ce qui dérègle le mécanisme de transmission des signaux de croissance et favorise ainsi la tumorigenèse. Dans une autre étude, il est cependant fait référence à une propriété de la capsid qui pourrait promouvoir l'induction de l'apoptose *via* NF- κ B⁹⁰.

Une autre protéine d'intérêt est NS5A, qui fait partie du mécanisme de réplication du virus. Elle est capable, via un domaine riche en proline (PXXP), de se lier à Grb2 et de l'inhiber. Grb2 est une protéine qui transmet normalement les signaux de croissance depuis le récepteur membranaire vers la voie des MAPK, et à la p85. C'est ce signal qui modifierait le schéma de réponse de la voie PI3K/Akt⁹¹. Enfin, en plus d'activer les facteurs de transcription NF- κ B et STAT-3⁹², NS5A est capable de modifier l'homéostasie calcique et d'induire un stress oxydatif. L'activation de STAT-3 («Signal transducer and activator of transcription protein» pour «Protéine transductrice du signal et activatrice de la transcription»), en plus de stimuler la croissance, est aussi un facteur majeur de la phase aiguë de l'hépatite.

Deux autres protéines impliquées dans une augmentation de la survie cellulaire sont E2 et NS3. Tout d'abord, comme E2 dispose d'un motif similaire au site de phosphorylation de eIF2 α et de la protéine kinase à ARN⁹³ (PKR pour «Protein Kinase RNA»), elle est capable d'inhiber cette dernière dont les deux fonctions essentielles sont de reconnaître les ARN double brins puis de déclencher la réponse cellulaire adaptée à une infection virale (synthèse d'interféron α). Le site d'entrée de l'ARN composant le génome du VHC dans le ribosome serait lui aussi capable d'inhiber la PKR⁹⁴. Ensuite, NS3 peut se lier aux protéines PKA (Protein kinase A) et PKC (Protein kinase C), impliquées dans diverses voies de signalisations⁹⁵, et ainsi moduler ces voies au profit du VHC.

Un des problèmes majeurs que pose le VHC est sa capacité à déjouer les défenses anti-virales de l'hépatocyte, essentiellement due à un taux de mutagenèse élevé. Le VHC utiliserait deux processus fondamentaux et complémentaires afin d'assurer sa pérennité. Premièrement, comme nous venons de le voir, il favoriserait la survie et la prolifération

cellulaires en activant constitutivement les voies de type ERK-MAPK. Ensuite, il empêcherait la cellule d'entrer en apoptose en réprimant son système de défense anti-viral en bloquant la PKR. Ce processus semble essentiel à la réplication du virus, car la capsid⁹⁶, E2⁹⁷, et NS5A^{98, 99} et même l'ARN viral jouent des rôles prépondérants dans l'inhibition de la PKR.

En définitive, le VHC est certes un virus non cytotoxique : il est capable de jouer sur l'activation de mécanismes de la survie cellulaire et de résistance à l'apoptose de multiples façons. Ainsi, le VHC, en dérégulant les voies de contrôle du cycle cellulaire, serait directement responsable de la formation d'hépatocarcinomes¹⁰⁰.

c) Fibrose et VHC

En raison des difficultés rencontrées dans l'établissement d'un modèle fiable permettant la compréhension de la réplication du VHC, l'étude des interactions entre les hépatocytes infectés avec la fibrose a été relativement difficile. La Figure 15³⁷ illustre les possibles voies empruntées par le VHC pouvant conduire à la formation de fibrose.

Selon ses auteurs, la capsid, NS3 et NS5A peuvent être à l'origine de la formation de radicaux d'oxygènes actifs, et ainsi favoriser l'accumulation de lipides en interagissant avec les apolipoprotéines, inhibant le transport des lipoprotéine à très faible densité (VLDL pour Very Low Density Lipoprotein). La capsid active le récepteur α pour les rétinoïdes X (RXR α pour Retinoid X Receptor α) qui, à son tour, active le récepteur α activé par la prolifération de peroxisomes (PPAR- α pour Peroxisome Proliferator Activated Receptor α), ce qui aboutit à l'inhibition du relargage des VLDL et la peroxydation des lipides. Les lipides peroxydés conduisent à la synthèse de TGF β , reconnu comme un des acteurs majeurs de la fibrogenèse.

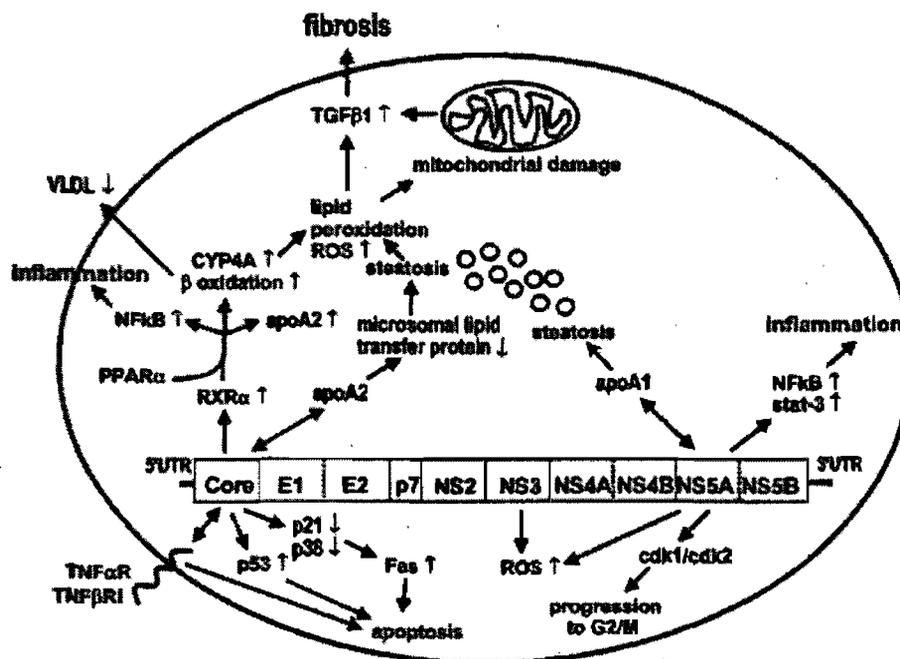


Figure 15 : Voies proposées pour l'activation de la fibrogenèse par le VHC

Néanmoins, l'essentiel de la fibrose n'est pas directement induite par le VHC et n'a pas pour origine directe le virus lui-même. C'est avant tout la réaction inflammatoire qu'il provoque au sein du parenchyme hépatique qui initie l'inflammation et par conséquent le processus amenant à la synthèse et au dépôt de fibrose.

B. Problématique et hypothèses

Le laboratoire étudie depuis longtemps l'impact du VHC sur le métabolisme de l'hépatocyte infecté, et plus particulièrement les effets du VHC sur les mécanismes de régulation de la croissance cellulaire (voies des MAPK entre autres).

Une de nos hypothèses est que le virus, dont la première mission est d'assurer sa survie, peut inhiber les capacités des cellules-hôtes à activer leurs mécanismes apoptotiques dans le but de faciliter sa survie. En effet, de nombreuses études⁸⁷ ont prouvé que le VHC pouvait activer, entre autres, les voies MAPK *in vitro*, pouvant ainsi prolonger la vie des hépatocytes infectés, parfois au point de les transformer.

Une seconde hypothèse est axée sur le fait que, en réponse à l'inflammation provoquée par le virus, le foie synthétise un excès de MEC, la fibrose. Cette fibrose, qui est unanimement reconnue comme néfaste à la fonction hépatique, pourrait en fait être bénéfique à la survie des hépatocytes. Nous croyons que le foie n'aurait pas développé un tel mécanisme, systématiquement mis à contribution quel que soit le type d'insulte, s'il n'avait pas au moins une fonction. Nous pensons en effet que cette fonction serait essentiellement dévolue à la protection et au maintien de la survie des hépatocytes, et serait consécutive à une action du collagène sur les voies de survie.

Par ailleurs, des observations cliniques font référence à des fluctuations du ratio des transaminases aspartate aminotransférase / alanine aminotransférase (AST/ALT) sériques, caractérisant l'état du foie et l'étendue de la fibrose, mais reflétant par la même occasion une modification du métabolisme hépatique. Ces modifications peuvent avoir de nombreuses causes, comme l'activité et/ou la charge virale(s), la présence de fibrose ainsi que la modification de l'environnement des hépatocytes au sein de l'organisation structurelle du parenchyme hépatique.

Nous avons donc cherché à évaluer quelles étaient les interactions entre les hépatocytes infectés par le VHC et la MEC, et à déterminer quelles sont les modifications métaboliques des hépatocytes en présence d'une concentration croissante de collagène, dans des conditions normales ou pro-apoptotiques.

Le premier objectif est de vérifier s'il y a effectivement une résistance à l'apoptose par des cellules infectées par le VHC. Ensuite, nous verrons si le collagène de type I, caractéristique de la fibrose, peut lui aussi protéger les cellules contre l'apoptose. Nous savons que la présence de collagène peut être une cause de l'activation des MAPK¹⁰¹ dans les hépatocytes humains, infectés par le VHC ou non. Il serait donc possible d'observer d'éventuels effets sur l'activation de cette voie au sein de lignées hépatocytaires.

Enfin, si l'activité métabolique hépatocytaire est modifiée, cela corroborerait les observations, dans le sérum des patients infectés, des modifications d'activités d'enzymes métaboliques hépatiques comme l'AST et l'ALT. Nous examinerons alors quels sont les

effets de l'infection et de l'accumulation de la MEC sur l'index AST/ALT, sensé refléter le métabolisme des acides aminés, l'état de santé du foie et l'avancement du degré de fibrose hépatique.

II. Matériel et méthodes

A. Matériels

L'HEPES et l'albumine bovine sérique (BSA) proviennent de chez Roche (Laval, QC). Le collagène de type I de queue de rat ainsi que les anticorps anti-ERK-MAPK proviennent de chez BD Biosciences (Mississauga, ON). Le milieu L-15, le Glutamax®, le DMEM et la pénicilline/ streptomycine ont été achetés chez GIBCO (Burlington, ON). Les réactifs pour électrophorèse ont été produits par Bio-Rad (Hercules, CA). Le sodium dodecyl sulfate (SDS) et le Tris proviennent de chez Invitrogen (Burlington, ON). Tous les autres réactifs proviennent de chez Sigma (Oakville, ON) sauf lorsque spécifié autrement.

B. Méthodes opératoires

1. Préparation des échantillons

a) Animaux

Des souris mâles de souche Balb/C (Charles River, St-Constant, QC) ont été utilisées pour certaines études pour mettre en évidence les différences des ratios AS/LT entre les souris chez qui une fibrose a été induite vs. des souris contrôles. Elles ont eu accès à de la nourriture de type Chow et à de l'eau *ad libitum*. Elles ont été soumises à des cycles de lumière/noirceur de 12h. Les souris utilisées ont été traitées selon les protocoles acceptés par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux du centre de recherche du CHUM.

b) Induction expérimentale de la fibrose hépatique

Les souris ont été séparées en deux groupes (contrôle et traitement fibrogénique). Dans le groupe traité, les souris ont été injectées par voie intra-péritonéale trois fois par semaine avec de la thioacétamide (TAA) [200µg/g] pendant 12 semaines, alors que les souris du groupe contrôle étaient quant à elles injectées avec une solution saline 0,9%. À la fin de la période de 12 semaines, les animaux étaient sacrifiés, les foies étaient alors

prélevés et directement congelés dans l'azote liquide et entreposés à -80°C en vue d'analyses ultérieures.

c) Foies humains

(1) Échantillons de foies humains et biopsies.

Les échantillons de foies et les biopsies proviennent d'une banque conservée à -80°C que le laboratoire a constituée en collaboration avec le service d'hépatologie et de chirurgie hépato-biliaire du CHUM (Hôpital St-Luc). Les échantillons de foies normaux ont été obtenus lors d'hépatectomies partielles, alors que les foies VHC+ et cirrhotiques ont été obtenus au moment de la transplantation. Tous les échantillons de foies humains ont été collectés suite au consentement des patients.

Les morceaux de foie ou les biopsies sont récupérés, puis pesés. Un volume de 3 µL de solution, un tampon phosphate salin (PBS 1X) froid ou du RIPA (1% Igepal CA-630, 0.5%, deoxycholate de sodium, 0.1% SDS, PBS 1X) selon l'expérience, est ajouté pour chaque mg d'échantillon, qui est ensuite homogénéisé. L'homogénat est alors récupéré puis soniqué. Un dosage Bradford¹⁰² de la concentration protéique de l'échantillon est alors réalisé (Cf. ci-dessous).

(2) Culots d'hépatocytes humains.

Les hépatocytes ont été isolés à partir de la technique de perfusion de collagénase telle que décrite par Guguen et al¹⁰³ avec certaines modifications. Le foie est tout d'abord recouvert de colle organique destinée à limiter les effusions des tampons qui suivront, puis est perfusé *via* une branche de la veine porte avec un tampon HEPES (HEPES : 10mM ; NaCl : 0,2M ; KCl : 2,6mM ; Na₂HPO₄, 7H₂O : 280µM) à pH 7.6 pendant 30 minutes pour vider le foie de son sang. Après quoi, une solution de collagénase de type II (Worthington, Lakewood, NJ) à 50mg% dans le même tampon HEPES additionné de 1.2mg/L de CaCl₂ (activateur de la collagénase) est ensuite perfusée pour une durée de 7 à 8 minutes. Le débit est maintenu à 7mL/minute à une température de 37°C. La capsule du

foie est ensuite transférée dans un milieu Leibovitz-15 (L-15) additionné d'albumine bovine sérique à 0.2% à pH 7,6 où les hépatocytes sont dissociés et libérés. La solution est ensuite filtrée sur une membrane de nylon de 74 µm et la solution cellulaire obtenue récoltée dans un tube de plastique stérile avec du L-15. Trois centrifugations de 72 g permettent d'éliminer les cellules mortes. Un décompte cellulaire selon la méthode d'exclusion au bleu de trypan est alors effectué. Une viabilité d'au moins 80% est requise pour la mise en culture.

d) Lignées cellulaires

Pendant nos expériences, nous avons eu recours, en plus de tissus, à des cultures de lignées cellulaires immortalisées. Toutes ces lignées ont été cultivées à 37°C, 100% humidité, 5% CO₂ avec du DMEM additionné de 10% de sérum de veau nouveau-né (NBCS), de 2 mM de Glutamax®, de 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine. La lignée 9-13, du fait de la présence d'un gène de résistance à la généticine®¹⁰⁷ incorporé dans le réplicon (Néomycine ou G-418), était cultivée selon la méthode décrite ci-dessus, sauf que le milieu était complété avec de la généticine (500 µg/mL de MEM) sauf pendant les expérimentations.

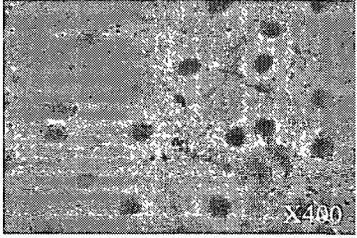
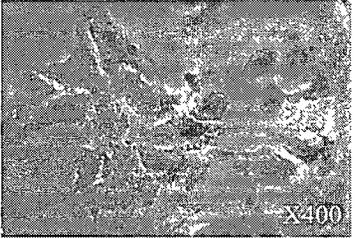
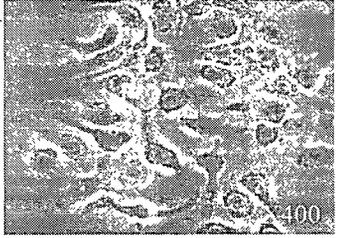
Tableau II(Toutes ces lignées ont été cultivées à 37°C, 100% humidité, 5% CO₂ avec du DMEM additionné de 10% de sérum de veau nouveau-né (NBCS), de 2 mM de Glutamax®, de 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine. La lignée 9-13, du fait de la présence d'un gène de résistance à la généticine® incorporé dans le réplicon (Néomycine ou G-418), était cultivée selon la méthode décrite ci-dessus, sauf que le milieu était complété avec de la généticine (500 µg/mL de MEM)

La lignée Huh7 est une lignée obtenue en 1982 à partir d'un hépatocarcinome provenant d'un patient japonais de 57 ans¹⁰⁴. La lignée 9-13 est une lignée Huh7 dans laquelle a été transfecté un réplicon sous-génomique du VHC de génotype I (Ce réplicon exprime les protéines NS3, NS4a et NS4b, NS5a et NS5b du VHC et dispose d'un gène de sélection pour résister à la Néomycine qui est ajoutée au milieu de culture (Généticine®)¹⁰⁵,¹⁰⁶. Enfin, la lignée Tx est une lignée issue de la lignée 9-13, mais ayant subi un traitement

à l'interféron- α_2 pendant 2 semaines à raison de 1000 U/mL avec changement de milieu toutes les 48 heures. Ce traitement a fait perdre à la lignée 9-13 son réplikon sous-génomique du VHC. Cette lignée a été obtenue au sein du laboratoire.

Toutes ces lignées ont été cultivées à 37°C, 100% humidité, 5% CO₂ avec du DMEM additionné de 10% de sérum de veau nouveau-né (NBCS), de 2 mM de Glutamax[®], de 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine. La lignée 9-13, du fait de la présence d'un gène de résistance à la généticine^{®107} incorporé dans le réplikon (Néomycine ou G-418), était cultivée selon la méthode décrite ci-dessus, sauf que le milieu était complété avec de la généticine (500 µg/mL de MEM) sauf pendant les expérimentations.

Tableau II : Morphologie des lignées cellulaires utilisées.

Huh7	9-13	Tx
		

2. Dosage de protéines selon la méthode de Bradford

Cette méthode a été décrite pour la première fois en 1976 par Bradford¹⁰² et *al.* pour permettre de réaliser des dosages précis de concentrations protéiques. Pour chaque dosage, un volume de N mL de Bradford 5X (Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad) 500 mg/L; Ethanol 100% 237,5 mL/L; H₂O 262,5 mL/L; Acide Phosphorique 85% 500 mL/L) est dilué dans 4 N mL d'eau distillée, où N représente de nombre d'échantillons. Parallèlement, une courbe standard est préparée avec de l'albumine sérique bovine (BSA).

Les échantillons de BSA suivis des échantillons de foie, sont dosés, en duplicata, au spectrophotomètre à 595 nm, et la moyenne des densités optiques de chaque échantillon est

comparée à la courbe standard BSA pour évaluer la concentration protéique de l'échantillon.

3. Analyse protéique

a) Préparation des échantillons, migration et transfert.

Les échantillons sont tout d'abord homogénéisés et soniqués dans 50 μ L de tampon RIPA + 2% v/v inhibiteur de protéase (10 μ g/ml de leupeptine, 10 μ g/ml d'aprotinine, 10 μ g/ml d'inhibiteur de trypsine de soja et 100mM de benzamidine) + 10 % v/v d'inhibiteur de phosphatase (NaF 21 mg/mL; β -Glycerophosphate 84,6 mg/mL; Na-Orthovanadate 1,8 mg/mL; 4-Nitrophénylphosphate 55,7 mg/mL; Phénylphosphate 2,2 mg/mL; EDTA 5 mg/mL). Un dosage de protéines est ensuite réalisé grâce à la méthode de Bradford afin de pouvoir prélever les 100 μ g de protéines dans un tampon Laemmli 2X (Tris 0.1M à pH 6.8, SDS 4%, Glycérol 20%, β -mercaptoéthanol 4% et 0.5mg/ml de bleu de bromophénol sur base d'eau). Les échantillons sont ensuite bouillis (100°C) pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines puis conservés sur glace pendant 2 minutes. Les échantillons sont ensuite déposés sur des gels SDS-PAGE 15% puis laissés à migrer pendant la nuit à 45V à température pièce.

Le lendemain, les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (Pall, St-Laurent, QC) par Transblot[®] (Biorad) à 30 volts durant la nuit.

b) Immuno-buvardage

L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration au rouge ponceau (0.1g de rouge ponceau dans de l'acide acétique 5%). Ensuite, les membranes de PVDF sont tout d'abord bloquées durant une heure dans du PBS 1X additionné de lait écrémé 10% et du Tween 0,05% (PBST) à température pièce avec agitation douce. Les anticorps primaires (Ac I^R) utilisés sont dilués dans du lait écrémé 1% + PBST (Tableau III) puis mis en contact avec la membrane sous agitation douce pendant 2 heures et demie. Trois lavages successifs de 10 minutes sont ensuite effectués dans du PBST, puis les anticorps secondaires (Ac II^R)

(Tableau III) couplés à la peroxydase (HRP pour « Horseradish peroxidase ») sont sélectionnés selon les besoins et dilués dans du lait écrémé 5% + PBST puis mis en contact avec la membrane pendant 1 heure sous agitation douce. Trois lavages de 10 minutes sous agitation rapide au PBST étaient ensuite réalisés.

Par la suite, les membranes sont exposées à une solution de luminescence électrochimique (PERKIN-ELMER Bioscience, Woodbridge, ON) puis sont révélées en les exposant à des films Kodak (Toronto, ON). Une fois révélés et fixés, les films sont scannés et la densité des bandes calculée avec le logiciel ImageJ¹⁰⁸ proposé sur le site du National Institute for Health.

Les mesures des densités des bandes des échantillons sont systématiquement rapportées à des mesures faites avec des anticorps anti-actine ou anti-MAPK totales (Tableau III) sur ces mêmes échantillons afin de comparer l'homogénéité de la quantité de protéines de chaque échantillon.

Tableau III : Fournisseurs et dilutions des anticorps primaires et secondaires dans les immuno-buvarrages.

Protéine	Ac I ^R		Ac II ^R			PM kDa
	Fournisseur	Concentration	Type	Fournisseur	Concentration	
Actine	Calbiochem	1 : 5 000	Anti-souris IgM	Calbiochem	1 : 10 000	42
tMAPK	Cell Signaling	1 : 1 000	Anti-Lapin	BD biosciences	1 : 2 500	42 et 44
pMAPK	Cell Signaling	1 : 1 000	Anti-souris	BD biosciences	1 : 2 500	42 et 44

Calbiochem (San Diego CA), BD Biosciences (Mississauga, ON), Cell Signaling (Beverly MA)

4. Boîtes de Pétri de collagène

Les boîtes de Petri de collagène sont préparées afin d'avoir une concentration de 13,9 µg de collagène type I de queue de rat (concentration nominale : 13,9 µg/cm² = 1X). Aussi, fonction de la quantité de boîtes de Petri nécessaires, la quantité de collagène requise est diluée dans le volume d'acide acétique 0,02M stérile nécessaire pour obtenir la concentration de collagène désirée. Selon le diamètre de la boîte de Petri, un volume (2mL pour des boîtes de Petri de 3,5 cm de diamètre, 10 mL pour les boîtes de Petri de 10 cm de diamètre) contenant la concentration requise (1X, 2X, 3X, 7X) de collagène type I de queue de rat est déposé. Le collagène est alors laissé à reposer pendant 2 heures afin qu'il se dépose sur la surface de la boîte de Petri.

Ensuite, l'acide acétique est aspiré, puis les boîtes de Petri sont rincées avec 5 mL de PBS 1X stérile puis mises à sécher pendant 2 heures, et enfin stockées à 4°C à la noirceur jusqu'à utilisation. Ces boîtes de Petri ainsi préparées peuvent être utilisées dans les 12 mois suivant si elles sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

5. Mesures des AST/ALT

Dans chacune des expériences, les cellules sont cultivées pendant 24 heures à 37°C, 100 % d'humidité, dans du DMEM sans sérum.

a) Mesure des activités intra-cellulaires d'AST et d'ALT

Les cellules sont directement grattées et soniquées dans 1 mL de PBS froid (4°C), leurs protéines dosées grâce à la procédure décrite par Bradford *et al.*¹⁰². Les mesures sont effectuées par le service de biochimie de l'hôpital par le multi-analyseur automatisé (Synchron LX Systems, LX-20 Beckman Coulter). Ces mesures sont systématiquement rapportées à la concentration protéique des échantillons correspondants.

b) Mesure de l'activité d'AST et d'ALT relarguée par les cellules

Cette mesure permet de connaître la vitalité des cellules face à un stress pro-apoptotique. Les cellules sont cultivées avec 10 mL de DMEM + 200 μ M d'étoposide pour une durée d'environ 30 heures. 2 mL des milieux sont récupérés, puis les cellules sont grattées dans 1 mL de PBS 1X froid. Lysats cellulaires et milieux sont ensuite soniqués puis envoyés en Biochimie pour dosage des activités enzymatiques. Les mesures obtenues du service de Biochimie de l'hôpital sont analysées selon la fonction suivante :

$$\text{Activité relarguée} = \frac{\text{Activité enzymatique du milieu}}{\text{Activité enzymatique du milieu} + \text{Activité enzymatique intra-cellulaire}}$$

Ce calcul nous permet d'obtenir la proportion relarguée des activités enzymatiques d'ALT et d'AST des cellules dans leur milieu de culture.

6. Décompte de l'apoptose au microscope à fluorescence

Après 24 heures d'exposition à 200 μ M d'étoposide à 37°C, 100% d'humidité et 5% CO₂, les milieux sont aspirés et les cellules fixées à la formaline 5% (FISHER, NEAPAN, ON) pendant 20 minutes puis rincées au PBS. Les cellules des boîtes de Petri sont ensuite colorées avec 2 mL d'une solution de Hoechst 33258 (0,25 μ g/mL) pendant 20 minutes à l'abri de la lumière.

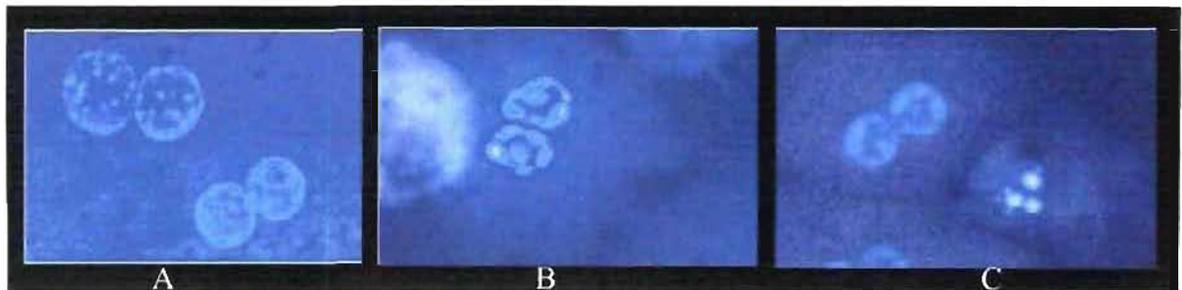


Figure 16 : Exemple de coloration au Hoechst 33258 d'hépatocytes de souris en culture primaire. A) Hépatocytes normaux; B) condensation et fragmentation de la chromatine; C) fragmentation et condensation nucléaires (apoptose).

Après avoir été lavées deux fois avec 2 mL de PBS, les cellules sont ensuite rincées à l'eau distillée, puis laissées à sécher pendant au moins 24 heures à l'abri de la lumière avant d'être observées pour décompte à l'aveugle sous microscope à fluorescence.

La quantification de l'apoptose par coloration nucléaire est possible grâce à la condensation et la fragmentation de la chromatine. Les différentes étapes de l'apoptose sont identifiable suite à une coloration nucléaire au Hoechst 33258. Les hépatocytes sont considérés comme apoptotiques lorsque la chromatine est soit condensée ou fragmentée¹⁰⁹. La quantification est réalisée par décompte cellulaire en microscopie à fluorescence (BX50F, Olympus Optical Co, Japon) à une excitation à 355nm et une émission à 465nm. L'index apoptotique est calculé en effectuant le ratio de noyaux apoptotiques sur un total d'au moins 400 noyaux. Les noyaux condensés sont considérés comme apoptotiques.

C. Tests statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel InStat[®], et consistent en des tests t de Student non appariés. Toute valeur de P inférieure à 0,05 a été considérée comme significative. Toutes les expériences ont été répétées au moins 3 fois.

III. Résultats

A. La résistance à l'apoptose

1. La résistance à l'apoptose conférée par le VHC

Comme tout virus, l'objectif du VHC est d'assurer sa survie face aux défenses innées et acquises de son hôte. Ainsi, le VHC a développé un large éventail de mécanismes de défense, lui permettant non seulement d'empêcher les cellules infectées de prévenir le système immunitaire, en inhibant la synthèse d'interféron- α et en réprimant le mécanisme de reconnaissance des ARN_{db} (PKR)⁹⁴ mais en plus, de forcer ces cellules à se multiplier en activant la voie de ERK-MAP kinase^{86, 88, 110}.

L'objectif est de vérifier si la présence du réplicon sous génomique (lignée 9-13) permet d'augmenter la résistance des cellules infectées à un composé chimique pro-apoptotique (Étoposide) par rapport aux lignées non infectées (Huh7 et Tx).

L'étoposide est un dérivé hémisynthétique glycosylé de la podophyllotoxine, actif sur de nombreuses tumeurs humaines. L'étoposide provoque une fragmentation de l'ADN par stabilisation du complexe clivable topo-isomérase II-ADN, fragmentation qui est proportionnelle à la concentration de la drogue et à la durée d'exposition¹¹¹. Les mécanismes de réparation de l'ADN étant saturés, les cellules entrent en apoptose.

Les lignées Huh7, 9-13, et Tx ont été mises en culture à une densité de 200 000 cellules par boîte de Petri de 3,5 cm de diamètre pendant 24 heures, avec du DMEM sans sérum, sous atmosphère à 37°C, 100% d'humidité et 5% de CO₂. L'apoptose a été induite en effectuant un changement des milieux, remplaçant le milieu initial de chaque boîte de Pétri par du DMEM sans sérum préchauffé à 37°C, tamponné au CO₂, et contenant 200 μ M d'étoposide, puis en laissant incuber pendant 24h. Les contrôles ont été réalisés en ajoutant le même volume de diméthylsulfoxyde (DMSO), qui est le véhicule de l'étoposide, dans le DMEM. Après coloration au Hoechst 33258, un décompte des noyaux apoptotiques a été effectué selon la méthode décrite plus haut.

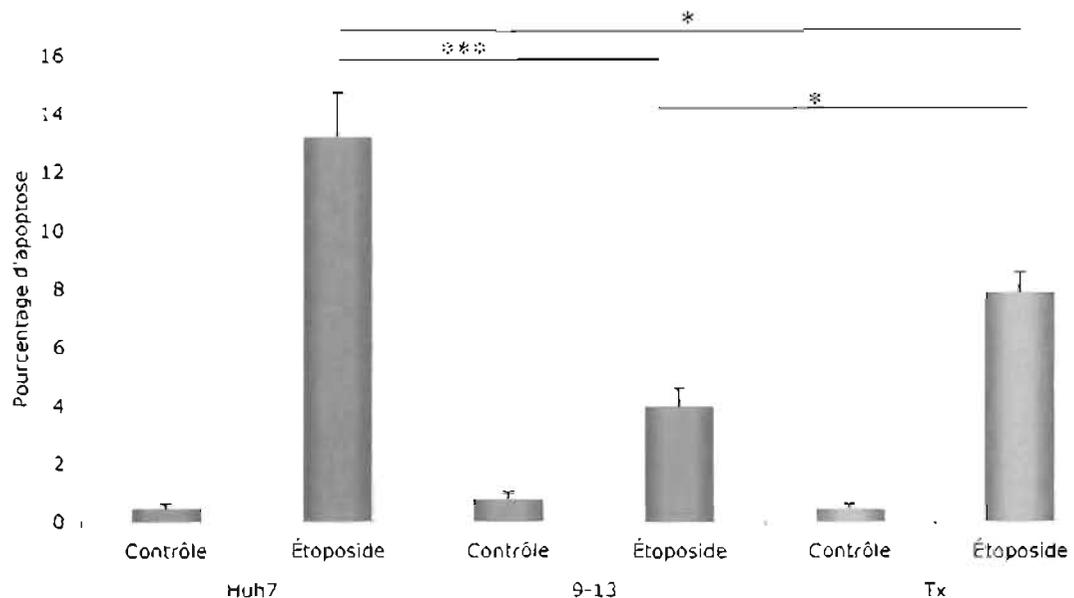


Figure 17 : Index apoptotique des lignées Huh7, 9-13, et Tx. * $P < 0,05$ *** $P < 0,005$ (test t de Student), $n=3$, expérience réalisée 3 fois, barres d'erreur : erreur type. Les lignées ont été colorées au Hoechst 33258.

Nous pouvons observer, sur la figure ci-dessus (Figure 17) que la lignée parentale Huh7 présente la plus grande sensibilité à l'apoptose, avec un taux de 13% +/- 1,5, comparativement à la lignée 9-13 qui présente quant à elle un taux apoptotique de 4% +/- 0,6 ($P < 0,005$). Cela signifie que la présence du réplicon sous-génomique du VHC exprimant les protéines NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B au sein des cellules 9-13 pourrait significativement réduire la sensibilité à l'apoptose induite par l'étoposide des cellules dans lesquelles il est exprimé. Considérant la lignée Tx, qui a perdu son réplicon, il apparaît que celle-ci recouvre au moins en partie sa sensibilité à l'apoptose (8% +/- 0,7), doublant celle-ci par rapport aux 9-13 (la différence avec la lignée 9-13 étant statistiquement significative).

Ces résultats suggèrent que l'expression des protéines virales codées par le réplicon ont la capacité d'induire une résistance accrue à l'apoptose chez les lignées l'exprimant. Il est donc possible que le VHC confère aux hépatocytes qu'il infecte une résistance accrue à

l'apoptose. Cependant, l'absence de recouvrement total de la sensibilité des Tx à l'apoptose au niveau des Huh7 reste énigmatique, et pose la question de la «qualité» de la guérison de l'infection des cellules 9-13. Enfin, l'absence de contrôle négatif de 9-13, c'est-à-dire de cellules 9-13 transfectée avec un réplicon ne contenant pas les protéines virales non structurales mentionnées plus haut, ne permet pas d'impliquer avec certitude le VHC dans la résistance à l'apoptose, celle-ci pouvant aussi être l'œuvre du réplicon seul. Il faudrait donc pouvoir disposer du réplicon «nu» pour pouvoir confirmer ou infirmer l'hypothèse de façon certaine.

2. La résistance à l'apoptose conférée par le collagène

Face à une infection du foie par le VHC, il se produit une réaction inflammatoire dont la conséquence immédiate est l'activation du processus de formation de la fibrose. Une des hypothèses principales du laboratoire est axée sur le rôle essentiel de la fibrose dans la protection des hépatocytes dans les moments de stress induits par des insultes chroniques.

Des expérimentations préliminaires réalisées sur des hépatocytes isolés de souris ont révélé que ceux-ci résistaient d'autant plus à une induction de l'apoptose par un anticorps anti-FAS que la densité de collagène sur laquelle ils étaient cultivés était importante.

Dans une autre expérience, des souris ont reçu des injections de TAA (200µg/g) à raison de 3 doses par semaine, afin d'induire de la fibrose hépatique, alors que les souris témoins recevaient une injection saline à 0.9%. Après 3 mois de traitement, les souris ont été soumises à une dose létale d'anticorps anti-FAS [10µg/g]. Le taux de mortalité des souris traitées à la TAA s'est révélé inférieur à celui des souris non traitées (données non montrées).

Aux vues de ces résultats, nous avons cherché à savoir si le collagène était aussi efficace pour protéger les lignées cellulaires de provenance humaine face à une induction de l'apoptose. À la différence du modèle murin, nous avons dû avoir recours à une

apoptose induite par voie chimique, les lignées Huh7 et affiliées n'expriment pas le récepteur FAS¹¹².

Nous avons donc repris l'expérience précédente, mais en cultivant les lignées sur les boîtes de Petri en plastique recouvertes ou non avec une densité croissante de collagène (1X, 2X et 3X). Les cellules ont été exposées à l'étoposide pendant une durée de 24 heures. Les noyaux ont ensuite été colorés au Hoechst 33258 puis ont été comptés sous microscopie à fluorescence selon le protocole expliqué plus haut.

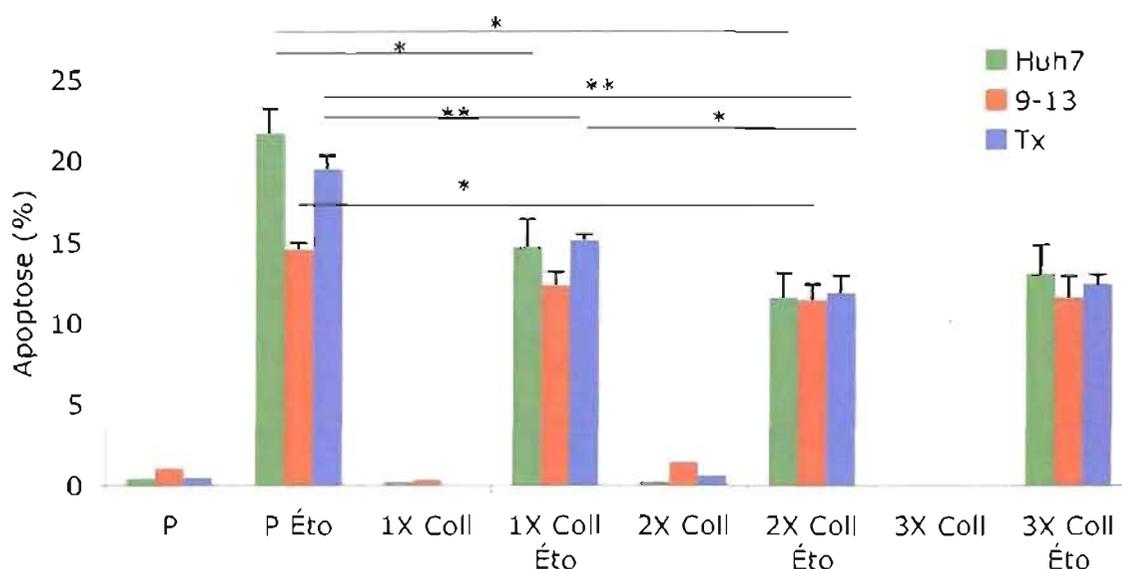


Figure 18 : Pourcentage d'apoptose en fonction de la présence d'étoposide 200 μ M, de la concentration du collagène et du type de lignée cellulaire (P : Plastique, Éto : étoposide 200 μ M; 1X Coll [13,9 μ g collagène type I de queue de rat/ cm^2]; 2X Coll : [27,8 μ g/ cm^2], 3X Coll [41,7 μ g/ cm^2]). *P<0,05, **P<0,01, n=3, expérience réalisée trois fois, Moyenne +/- erreur type.

Ces résultats, outre le fait qu'ils appuient ceux obtenus à la figure précédente (Figure 17) en confirmant une résistance accrue à l'apoptose de la lignée 9-13 sur support sans collagène, démontrent en plus l'effet protecteur conféré par une densité croissante de collagène sur les lignées cellulaires cultivées en présence d'un produit pro-apoptotique. En effet, en regardant les trois lignées, il apparaît que leurs sensibilités à l'apoptose diminuent alors qu'augmente la concentration de collagène.

La lignée Huh7 cultivée 24 heures en conditions pro-apoptotiques, qui présente un taux d'apoptose de 22% +/- 1,6 sur un support sans collagène, voit ce taux progressivement diminuer 1,5 fois à 14% +/- 1,8, 2 fois à 11,5% +/- 1,6, et 1,7 fois à 13% +/- 1,8% quand la densité de collagène est de 13,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1X) 27,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (2X), et 41,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (3X) respectivement. La lignée 9-13, que nous savions déjà plus résistante grâce à la présence du réplicon sous-génomique du VHC, voit elle aussi sa sensibilité à l'apoptose diminuer et passer de 14,5% +/- 0,4 en culture sur boîte de Petri sans collagène à 12,2% +/- 0,9, 11,3% +/- 1, et 11,5% +/- 1,3 avec les densités de collagène respective citées ci-dessus. Quant à la lignée Tx, elle semble suivre de façon assez proche la courbe observée avec la lignée Huh7 avec, sur boîte de Petri sans collagène, un taux d'apoptose de 19,5% +/- 0,8, qui passe à 15,1% +/- 0,4 avec une densité de collagène de 13,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, à 11,8% +/- 1,1 à 27,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, et finalement à 12,3% +/- 0,6 à 41,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de collagène.

Ce résultat suggère donc qu'il existe un effet protecteur conféré par la présence de collagène de type I sur les lignées cellulaires, et que cet effet est d'autant plus marqué que la densité de collagène est importante.

Nous avons alors cherché à comprendre quelles pouvaient être les raisons qui favorisent une telle résistance à l'apoptose.

B. L'activation des MAPK

D'abord, nous avons décidé d'évaluer le/les mécanisme(s) potentiel(s) de la protection offerte par le collagène et par le VHC. Étant donné que le VHC et le collagène ont tous les deux la capacité d'activer la voie des MAPK de survie cellulaire, (le collagène *via* les intégrines¹⁰¹, et le VHC en interagissant directement avec les protéines régulant les différents étages de la voie ERK-MAPK, *cf.* plus haut (Figure 14), la voie à cibler était toute désignée.

La voie ERK-MAPK est une des voies intra-cellulaires de transmission de signaux extra-cellulaires de multiplication ou de différenciation. Quand cette voie vient à être dérégulée, les hépatocyte entrent dans un processus de prolifération non contrôlé¹¹³.

L'objectif des expériences décrites ci-dessous est de déterminer s'il y a une différence d'expression et/ou d'activité des MAPK dans les lignées cellulaires cultivées sur des densités croissantes de collagène, et dans les foies des patients infectés par le VHC comparativement à des foies de patients non infectés. Il s'agit donc de vérifier l'hypothèse selon laquelle le collagène, et le VHC, sont capables d'activer la voie ERK-MAPK.

1. Activation des MAPK par le collagène

Nous avons donc mis en culture les lignées à 37°C, 100% d'humidité, 5% de CO₂, pendant 24 heures, en présence de DMEM sans sérum sur des densités croissantes de collagène (P, contrôle : boîte de Petri en plastique; 1X : 13,9µg/cm²; 3X : 41,7 µg/cm²; 7X : 97,3µg/cm²) puis réalisé un immuno-buvardage de type Western Blot pour révéler les ERK1-MAPK phosphorylées.

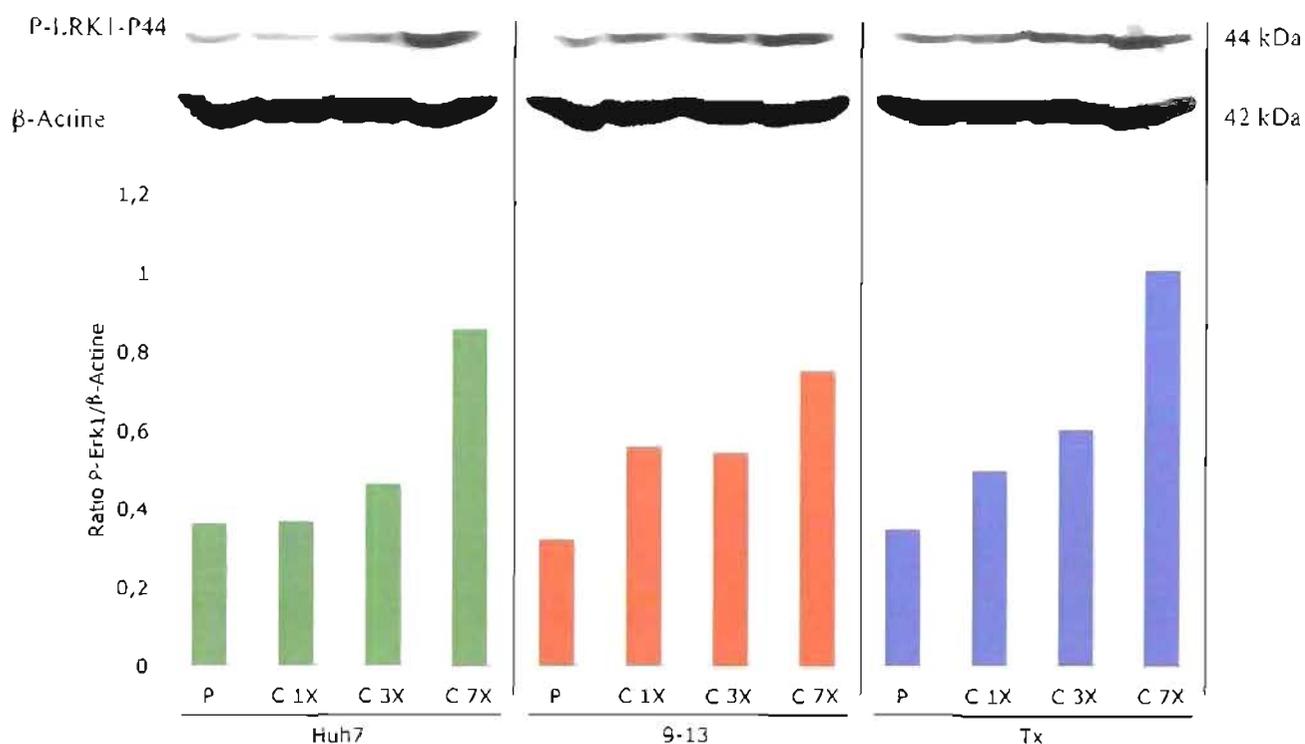


Figure 19 : Effet de la densité de collagène sur l'activité de ERK-1. (P : Plastique, C : Collagène, 1X, 3X, 7X : Concentration relative du collagène (1X : 13,9 µg/cm²)). n=1

Comme nous pouvons l'observer (Figure 19), les densités des bandes révélées par un anticorps anti-phospho-ERK1 augmentent en fonction de la densité de collagène. Bien que cette expérience soit à répéter, ces résultats suggèrent que le collagène est un activateur de la voie ERK-MAPK et joue un rôle dans le processus de survie des lignées.

Pour comparer les deux expériences relatives à la résistance à l'apoptose induite par la présence de collagène et l'activation des MAPK, les concentrations de collagène utilisées ont dû être différentes. Ces différences reposent sur le fait que l'entrée en apoptose des hépatocytes a démontré une sensibilité plus élevée à la concentration de collagène que l'activation des MAPK, qui, elle, a nécessité de plus grandes variations de concentrations pour être observable sur un transfert de membrane de type Western-Blot.

2. Activation des MAPK dans des homogénats de foies de patients VHC positifs ou négatifs

Afin de vérifier notre seconde hypothèse relative à l'activation de la voie ERK-MAPK par le VHC, nous avons utilisé des échantillons provenant de foies humains.

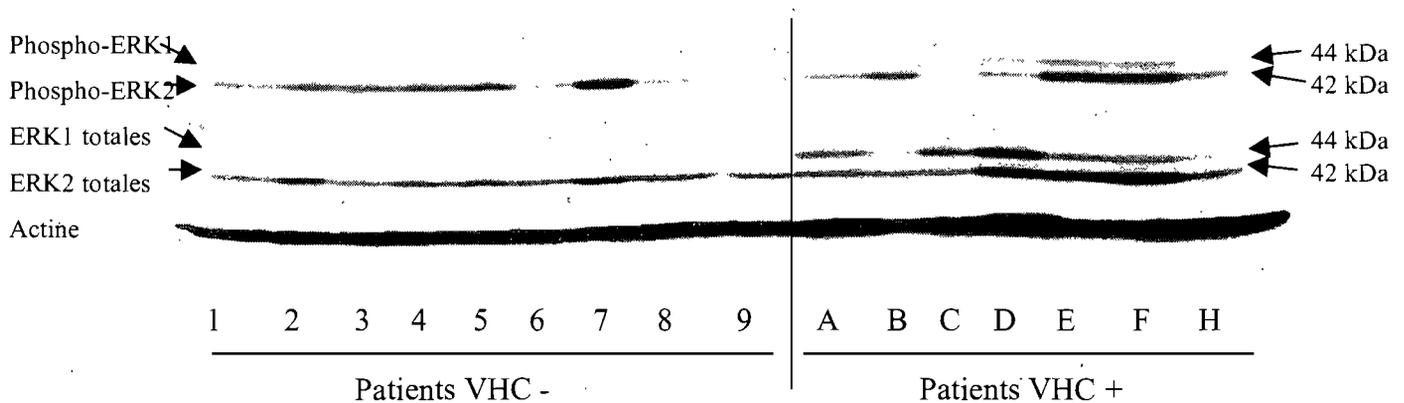


Figure 20 : Immuno-buvardage révélant l'activation des ERK-MAPK (Phospho-MAPK) . Les ERK1/2 activées (phosphorylées) ont été comparées aux ERK1/2 totales sur des homogénats de foies de 15 échantillons différents (8 VHC - et 7 VHC +).

Des échantillons de foies humains, infectés ou non par le VHC, ont été homogénéisés pour réaliser un immuno-buvardage destiné à révéler l'activation des ERK1-MAPK.

Là aussi, la présence des ERK1 (44 kDa) phosphorylée et totale semble plus prononcée chez les foies issus de patients infectés par le VHC par rapport aux foies issus de patients non infectés, ce qui laisserait supposer une activation plus importante de ERK-1/2 par le VHC. Par ailleurs, les foies infectés sembleraient aussi plus prompts à synthétiser plus de MAPK-ERK-1/2 (Possiblement en raison de l'accumulation de fibrose au sein de ces foies). Cependant, l'hétérogénéité observée des résultats obtenus selon les foies des patients n'a pas permis de mettre en évidence une significativité statistique (Figure 20).

Il apparaît, en général, que les foies infectés par le VHC, qui sont au stade F4, auraient des activités ERK-MAPK bien plus prononcées que les foies non infectés ne présentant pas de fibrose (données non montrées). Ainsi, le collagène et le VHC seraient tous les deux responsables de l'activation de la voie ERK-MAPK des hépatocytes quand ceux-ci subissent une insulte de type inflammatoire. Il s'agirait donc d'un processus destiné à promouvoir la survie des hépatocytes, c'est-à-dire d'une part une forme d'adaptation des hépatocytes aux changements de leur environnement destinée à promouvoir leur survie, et d'autre part un mécanisme assurant la pérennité du virus.

Les conséquences d'une telle activation sont larges et complexes. Des observations réalisées par les pathologistes révèlent que, pour une raison inconnue, les taux de transaminases sériques des patients infectés par le VHC augmentent. Comme nous l'avons vu plus haut, la corrélation entre l'augmentation de ces protéines hépatiques dans le sérum des patients et leur degré de fibrose hépatique est telle que des équipes de recherche s'en sont servis pour mettre au point les tests de fibrose que nous avons vu. Nous pouvons dès lors nous demander quel est le lien entre le degré de fibrose, l'activation des MAPK, et l'activation du métabolisme que nous révèle ces protéines. Par ailleurs, l'activation des MAPK révèle une activation du cycle cellulaire et du métabolisme. Il est donc possible que la fibrose puisse activer, directement ou indirectement, le cycle cellulaire des hépatocytes.

C. L'origine de la modulation du ratio AST/ALT sérique chez les patients ayant un foie fibrotique

Il est maintenant communément admis que l'un des marqueurs de la fibrose hépatique le plus répandu est le ratio AST/ALT, c'est-à-dire le ratio des activités sériques des enzymes AST et ALT. Comme ces résultats proviennent de sérums de patients atteints d'hépatopathies chroniques, nous avons d'abord réalisé des expériences qui avaient pour but de déterminer si des résultats semblables, c'est-à-dire des modulation de ce ratio, étaient observables au sein même du foie, voir même des hépatocytes.

1. Mesures d'activité AST et ALT dans différents échantillons

a) Activités dans des échantillons de foies homogénéisés normaux, F4-HCV et F4 non-HCV

Cette étude a été effectuée sur des échantillons de foies humains (10 provenant de foies HCV cirrhotiques; 8 de foies cirrhotiques non HCV; et 10 de foies non HCV non cirrhotiques). Les résultats des mesures des activités enzymatiques ont été rapportés à la concentration protéique de chaque échantillon (Figure 21).

Il apparaît ici que les concentrations d'AST ne varient pas au sein du foie, alors que les concentrations d'ALT diminuent. La fibrose serait donc impliquée dans une diminution de l'activité de l'ALT hépatique.

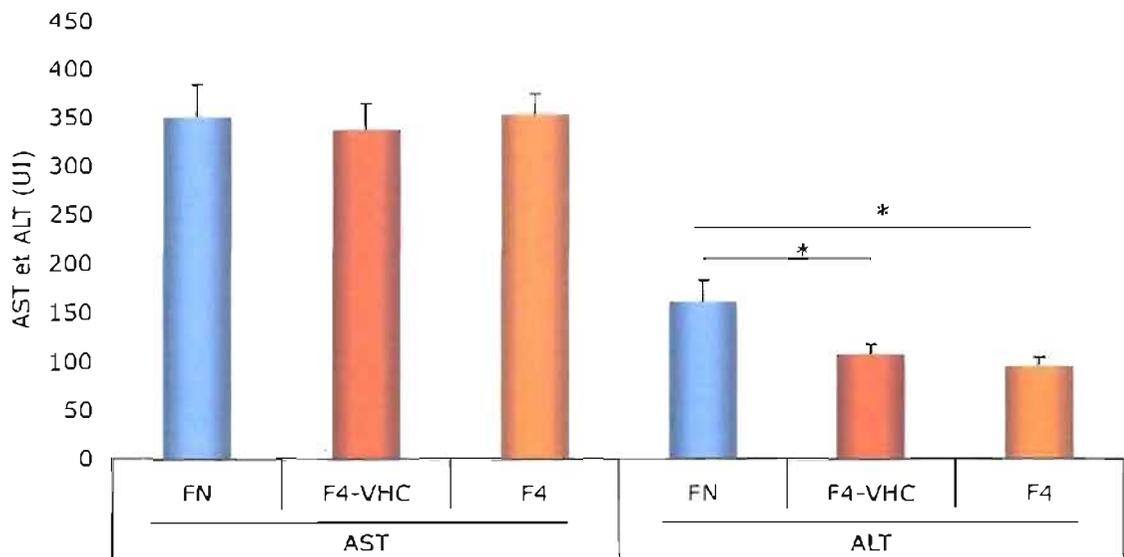


Figure 21 : Activités enregistrées des AST et ALT selon le type d'hépatopathie. n=10 foies de patients avec un foie normal, 8 ayant un foie F4-VHC+, et 10 ayant un foie F4-. (FN : Foie Normal ; F4-VHC : Foie cirrhotique infecté par le VHC ; F4 : Foie cirrhotique)
 * $P < 0,05$; moyenne +/- erreur type.

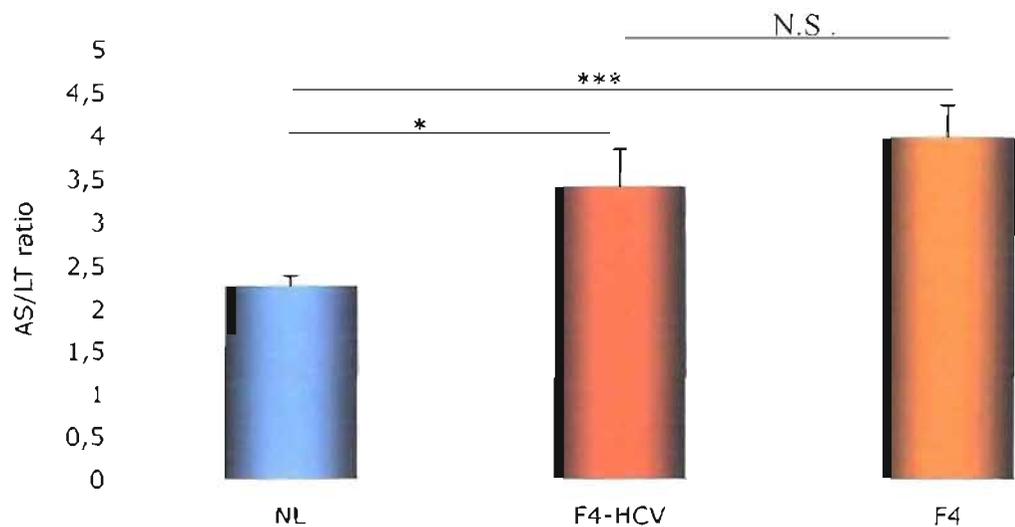


Figure 22 : Ratio AS/LT enregistrés selon le type d'hépatopathie, ratio obtenu à partir des données utilisées pour la Figure 21. (FN : Foie Normal, n=10 ; F4-VHC : Foie cirrhotique infecté par le VHC, n=10 ; F4 : Foie cirrhotique, n=8). N.S. : Non Significatif ; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, Moyenne +/- erreur type.

Nous pouvons observer une augmentation du ratio AS/LT en présence de fibrose, manifestement due à la diminution de l'activité de l'ALT hépatique. Cependant, le VHC ne semble influencer que faiblement sur ce ratio (Comme en atteste l'absence de significativité entre les échantillons F4-HCV et F4). Par contre, les concentrations d'ALT intra-hépatiques sont plus basses dans les foies fibrotiques que dans les foies normaux. Ceci favorise l'augmentation du ratio AST/ALT, comme illustré Figure 22.

Toutefois, les variations d'activité des AST et des AST intra-hépatiques observées en situation de fibrose hépatique peuvent être secondaires à des modifications à l'intérieur des hépatocytes, mais peuvent aussi provenir d'autres cellules hépatiques voire même du tissu fibreux lui-même.

Nous avons alors décidé de mesurer les activités enzymatiques de l'AST et de l'ALT sur des ponctions biopsies, qui, même si elle ne représente qu'une toute petite partie de foie, ont l'intérêt d'être généralement prélevées dans le même endroit du foie; et représentant l'état du foie à différents degré de fibrose.

b) Activités dans des biopsies de foies normaux et infectés par le VHC

Nous avons ainsi mené une étude sur des biopsies provenant de foies humains présentant des états de fibroses de F1 à F4 (échelle de Knodell¹¹⁴). Les activités enzymatiques ont été comparées individuellement (Figure 23, page suivante).

Cette figure démontre que les activités hépatiques des AST et ALT provenant de biopsies peuvent être relativement disparates, ce qui serait compréhensible quand on sait qu'une biopsie représente 1/50 000^e du volume du foie, et que les hépatopathies peuvent être très différentes d'un patient à l'autre. Cependant, nous observons systématiquement une activité ALT inférieure à l'activité AST.

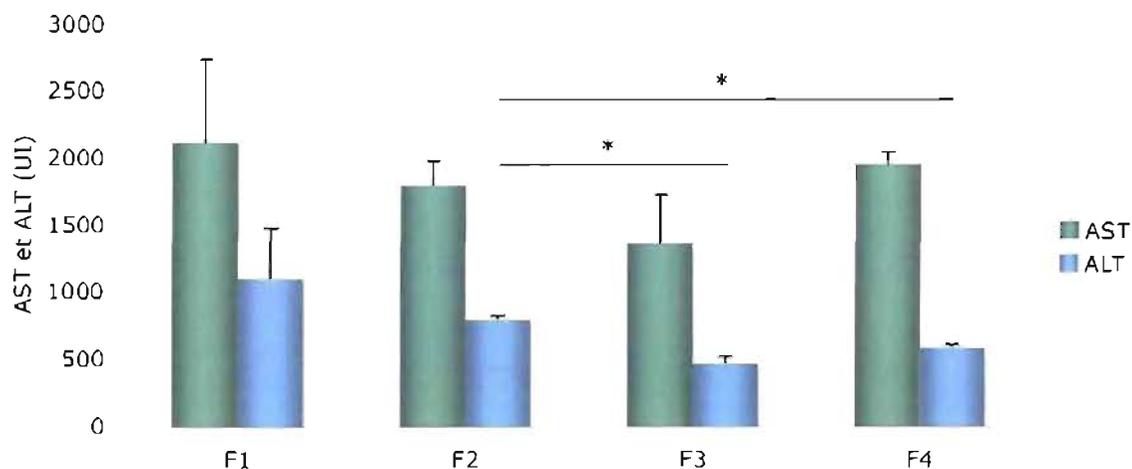


Figure 23 : Activités AST et ALT dans des biopsies à différents degrés de fibrose. Les biopsies ont été réalisées sur des foies non infectés par le VHC, avec 1 échantillon provenant de deux patients différents pour chaque degré de fibrose. (Moyenne \pm erreur type; Statistiques : test T de Student; * : $P < 0,05$)

Quand nous effectuons les ratios pour déterminer le rapport AST-ALT, nous pouvons observer les résultats dans la figure suivante (Figure 24).

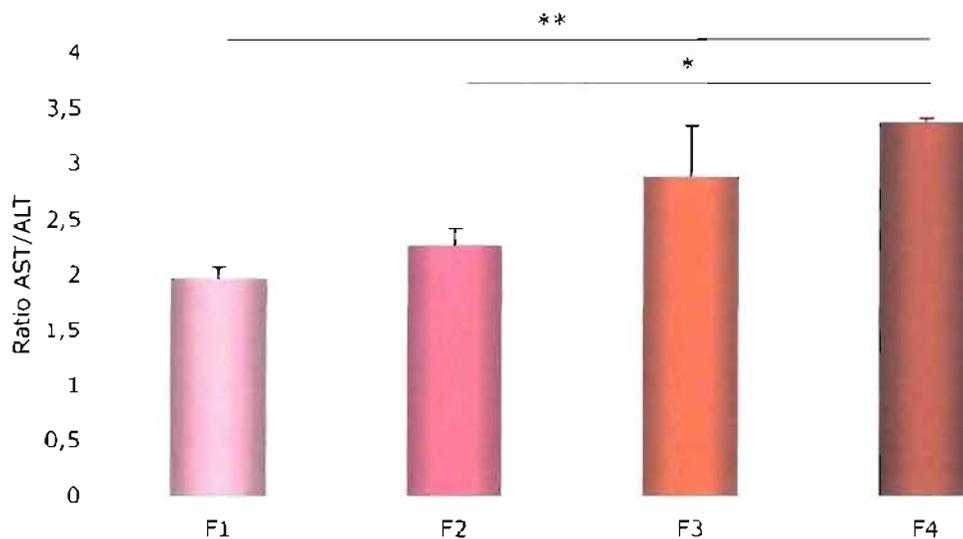


Figure 24 : Ratios AST/ALT de biopsies de foies à différents degrés de fibrose. (n=2, Moyenne \pm erreur type, * : Statistiques : Test t de Student ; $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$).

Les ratios AST/ALT réalisés avec chaque échantillon montrent bien une augmentation évoluant de concert avec le stade de fibrose diagnostiqué, permettant ainsi

d'établir une corrélation entre le stade de fibrose et le ratio AST/ALT. Bien que nous puissions observer une tendance de l'évolution du ratio AST/ALT en fonction du stade de fibrose, nous n'avons pu obtenir de résultats significatifs faute de disposer d'un nombre d'échantillons.

c) Activités des hépatocytes isolés de foies normaux et infectés par le VHC

Aussi, afin d'affiner notre modèle, et pour s'assurer de la provenance des modulations des AST et ALT observées chez les patients infectés par le VHC, nous avons mesuré les activités de ces transaminases au sein même des hépatocytes. Ainsi, des culots d'hépatocytes humains vivants (1 million) isolés, provenant de foies de patients infectés par le VHC ou non, ont ainsi été testés. On remarque que l'infection par le VHC ayant engendré une cirrhose fait fortement augmenter la concentration ou l'activité intracellulaire de l'AST, alors que les concentrations ou activités de l'ALT diminuent (Figure 25).

Les figures 25 et 26 (page suivante) mettent en évidence une différence dans les activités de l'ALT, et plus faiblement, de l'AST intracellulaire ; ainsi qu'une augmentation du ratio AS/LT dû à la diminution de l'activité de l'ALT.

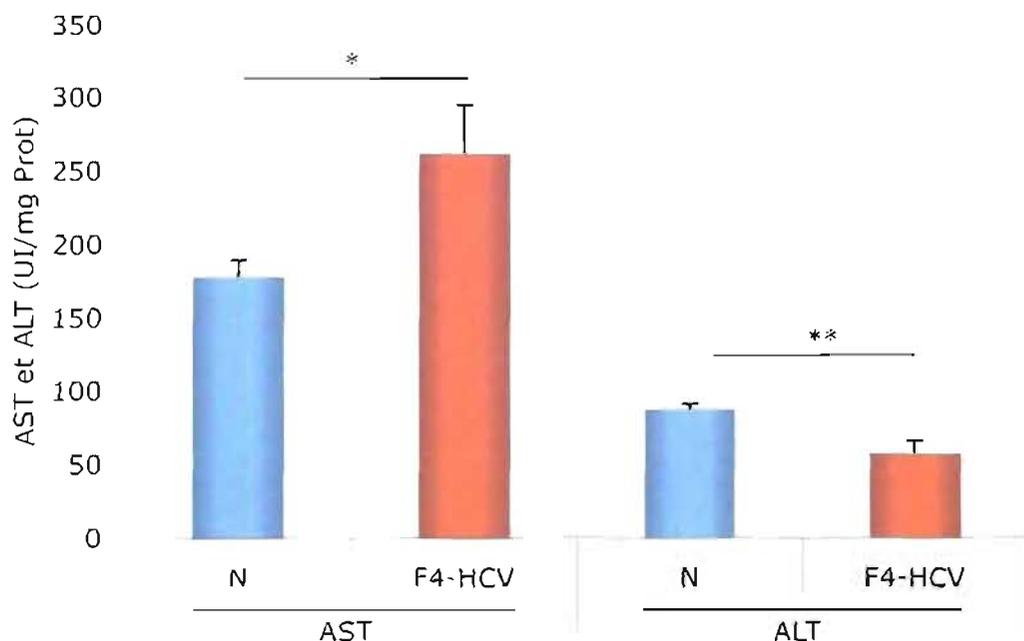


Figure 25 : Modulations des AST et ALT dans les hépatocytes humains infectés ou non par le VHC à partir d'un million d'hépatocytes vivants. N : Hépatocytes provenant de foie normal (n=9); F4-VHC : Hépatocytes provenant de foies infectés par le VHC (n=9, Moyenne +/- erreur type, test t de student). * P<0,05 ; ** P<0,01

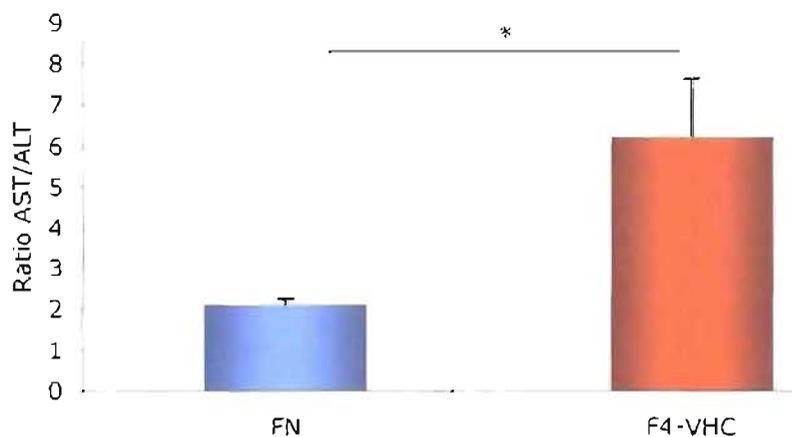


Figure 26 : Comparaison des ratios AST/ALT dans les hépatocytes humains isolés partir de foies infectés par le VHC. FN : Hépatocytes provenant de foie normal (n=9), F4-VHC : Hépatocytes provenant de foies infectés par le VHC (n=9, Moyenne +/- erreur type, test t de student). * P<0,05

Nous avons ainsi pu constater, que nous observions des échantillons, des biopsies, ou des culots d'hépatocytes, que le ratio AST/ALT augmentait en fonction du degré de fibrose des foies dont provenaient nos échantillons. Cette augmentation est surtout due à une diminution de l'activité de l'ALT intracellulaire et, de façon moins importante, à une augmentation de l'AST.

d) Activités dans des foies de souris normales et fibrotiques

Afin de parfaire notre modèle, nous avons ici utilisé des souris qui avaient subi un traitement fibrogénique à la TAA. Un tel traitement fibrogénique induit des dommages hépatocytaires, de la nécrose, une réaction inflammatoire, et finalement la formation et le dépôt de fibrose qui se répand pour rejoindre les structures vasculaires des sinusoides hépatiques, ce qui permet d'assister au développement d'un stade pré-cirrhotique¹¹⁵.

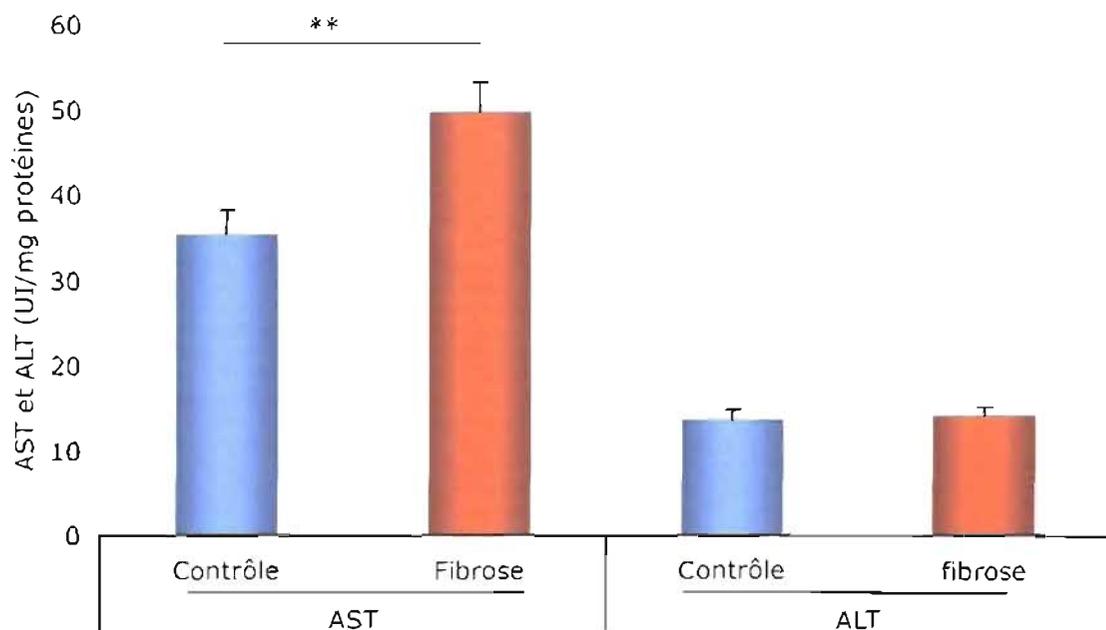


Figure 27 : Activité AST et ALT dans des homogénats de foies murins. Les souris ont subi un traitement pro-fibrotique ou contrôle (200 µg/g TAA, pendant 3 mois, 3 fois par semaine vs salin 0,9%). (n= 8 souris / condition) (Moyenne ±/- erreur-type; Test t de Student; ** P<0,01)

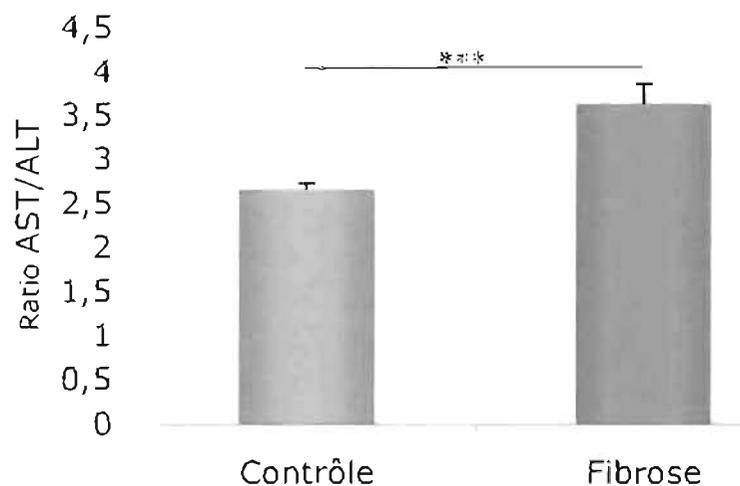


Figure 28 : Comparaison des ratios AST/ALT chez les souris ayant subi un traitement fibrogénique ou non. (Moyenne +/- erreur-type; Test t de Student; *** P<0,005)

La Figure 27 démontre ici que l'augmentation du ratio AST/ALT observé dans ce modèle est surtout causée par une augmentation de l'activité de l'AST chez les hépatocytes provenant de souris ayant subi le traitement fibrogénique.

La conséquence immédiate de cette augmentation de l'activité de AST intra-hépatique est une élévation du ratio AST:ALT très significative, passant de 2,7 pour les homogénats de foies normaux à plus de 3,5 pour les homogénats de foies fibrotiques (P<0,005). Ce modèle vient corroborer les observations que nous avons faites avec les échantillons de foies humains qui démontraient une augmentation du ratio AST/ALT.

En règle générale, quel que soit le modèle utilisé, nous observons bien une corrélation entre le degré de fibrose et l'élévation du ratio AS/LT. Cependant, force est de constater que les raisons de l'élévation de ce ratio ne sont pas les mêmes. En effet, nous observons une diminution de l'ALT chez l'homme, alors que dans le modèle murin, c'est l'AST qui s'élève. Il est certain que de plus amples recherches à ce sujet restent à compléter.

Néanmoins, la fibrose, qu'elle soit induite par une infection par le VHC, une intoxication ou par un traitement fibrogénique, est responsable d'une élévation du ratio AST/ALT. Nous avons préalablement observé que la fibrose était responsable d'une part de l'activation des MAPK, impliquées dans l'activation du cycle cellulaire. Il serait donc possible que les hépatocytes, entourés de fibrose, activent leur cycle cellulaire, et parallèlement, leur métabolisme. Il est enfin à noter que cette activation pourrait être très profitable au VHC, qui, en disposant de cellules métaboliquement actives, serait plus apte à se reproduire et survivre.

2. Les modulations des concentrations de l'aspartate et de l'alanine intra-hépatocytaires.

Afin de vérifier s'il y avait de réelles modifications du métabolisme hépatocytaire, nous avons effectué une chromatographie liquide à haute pression (HPLC) sur 5 échantillons de culots secs d'hépatocytes, provenant de foies normaux ou cirrhotiques, afin de mettre en évidence les différentes concentrations d'alanine et d'aspartate intra-hépatocytaires. Cette opération a été réalisée grâce au service de biochimie analytique du Dr Pierre Allard, de l'Hôpital Ste-Justine de Montréal (Figure 29) :

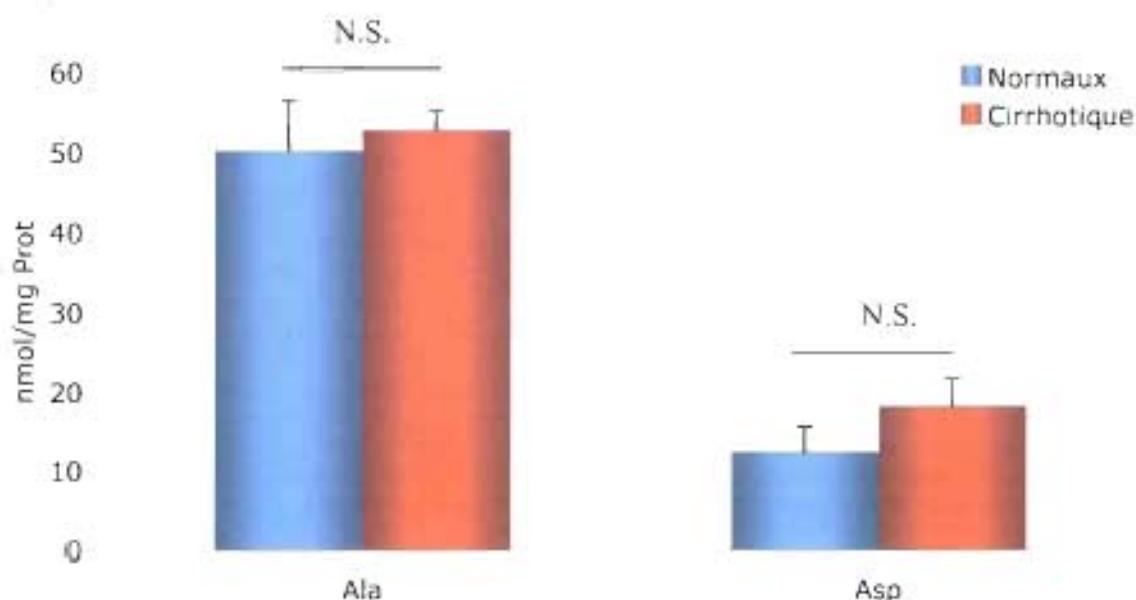


Figure 29 : Variations des concentrations de l'alanine (Ala) et le l'aspartate (Asp) intra-hépatocytaires entre culots d'hépatocytes isolés provenant de foies normaux (Normaux, n=5) et de foies cirrhotiques (Cirrhotique) (n=5; N.S. : non significatif).

Nous n'avons pu mettre en relief une réelle différence entre les concentrations d'acides aminés avec cinq échantillons, mais il est une augmentation du nombre d'échantillons future nous permettrait vraisemblablement d'observer des différences significatives révélant de réelles distinctions dans les concentrations d'acides aminés intra-hépatocytaires.

IV. Discussion

A. Collagène, VHC et résistance à l'apoptose

Le collagène, présent à faible concentration dans la MEC des foies normaux, voit sa synthèse et son dépôt fortement augmenter lors d'une infection chronique par le VHC. En cultivant des lignées cellulaires en conditions pro-apoptotique, nous avons pu constater une résistance accrue de la lignée exprimant le réplicon sous-génomique du VHC. Par la suite, en cultivant ces lignées sur des supports avec ou sans collagène, nous avons pu observer que la présence de collagène était aussi un facteur capable de moduler la physiologie et le métabolisme des hépatocytes.

1. Résistance à l'apoptose conférée par le réplicon sous-génomique du VHC

Ainsi, en se référant aux expériences réalisées (Figure 17), nous constatons que la présence du réplicon sous-génomique du VHC codant les protéines NS3 à NS5B est un facteur capable d'induire un certain degré de résistance à l'apoptose. Bien que la littérature y fasse souvent référence, des articles contradictoires affirment les rôles pro- ou anti-apoptotiques des protéines virales étudiées individuellement, mais sans utiliser de modèle global^{82, 83, 107}. Les résultats obtenus par ces équipes sont alors propres aux modèles utilisés, mais ne permettent pas d'identifier ce qu'il en est dans la réalité. Ceci est essentiellement expliqué par la mise au point tardive d'un modèle de répllication virale intégrale¹¹⁶.

Néanmoins, l'utilisation de la lignée 9-13 proposé par Lohman et *al.*¹⁰⁵ repose sur le fait qu'il s'agit d'un modèle, certes incomplet car n'exprimant les protéines non structurales, mais ayant l'avantage triple d'être le modèle le plus proche de la réalité, d'être universellement utilisé et de provenir d'un virus de génotype 1, qui est le génotype du VHC le plus courant. D'autres modèles, plus complets car exprimant l'intégralité d'un génome viral, sont apparus depuis peu, mais ne sont pas encore disponibles au laboratoire.

Aussi, bien que nos études aient utilisé le modèle cellulaire du réplicon sous-génomique (9-13) ne comportant pas les protéines structurales du VHC, elles permettent

cependant d'avancer un rôle des protéines non-structurales du virus dans la résistance à l'apoptose. Ainsi, les protéines non-structurales du VHC, qui ne sont autres que les protéines responsables de la réplication du virus, seraient impliquées dans un processus assurant la survie et la multiplication des cellules infectées.

Par contre, l'absence de réplicon dans la lignée Tx ne permet pas d'expliquer le non-retour à un pourcentage d'apoptose comparable à celui présenté par les Huh7. Il est probable que les Tx portent encore des caractéristiques propres au virus (ou induite par ce dernier) permettant une résistance à l'apoptose, amoindrie mais encore présente.

L'utilisation des cellules 9-13 a donc permis d'établir un modèle de résistance à l'apoptose induite par la présence du réplicon du VHC, et d'incriminer au moins en partie les protéines non structurales dans la résistance à l'apoptose. Cependant, conscient que le modèle utilisé reste incomplet, une prochaine étape consisterait à vérifier ces observations en utilisant un modèle de réplication intégral tel le modèle JFH-1¹¹⁶.

2. Résistance à l'apoptose conférée par la présence de collagène.

Les lignées cellulaires ont aussi été cultivées sur des densités croissantes de collagène afin de simuler l'apparition de fibrose. Ces cellules, mises en contact avec l'étoposide, ont développé une résistance à l'apoptose qui était fonction de la concentration de collagène sur laquelle elles étaient cultivées.

En effet, le collagène est connu pour pouvoir fixer, via un motif RGD (Arg-Gly-Asp), les intégrines exprimées à la surfaces des cellules¹¹⁷. Ces intégrines, protéines membranaires constituées de 2 chaînes $\alpha\beta$, sont reliées à un mécanisme d'activation du métabolisme et du cycle cellulaire *via* la voie des MAPK. Les intégrines que l'on retrouve dans le foie à l'état normal sont les hétérodimères $\alpha1\beta1$, $\alpha5\beta1$, et $\alpha9\beta1$. Chaque chaîne α a sa propre protéine cible; la chaîne $\alpha1$ reconnaissant spécifiquement le motif RGD du collagène¹⁰¹. Les intégrines sont dépourvues d'activité kinase, ce qui les rend dépendantes

d'autres protéines pour transmettre le signal de contact avec du collagène. Les changements conformationnels des intégrines consécutifs à une liaison avec le collagène de la MEC leur permettent de recruter plusieurs protéines adaptatrices qui vont permettre au signal d'être véhiculé depuis l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme pour y être interprété. Ces protéines adaptatrices que sont l'ILK (Integrin-Linked Kinase), la FAK (Focal Adhesion Kinase), et la PINCH (Particularly Interesting New Cysteine Histidine rich protein)¹¹⁸ entrent en contact avec l'intégrine pour relayer le signal et activer différentes voies effectrices comme la voie AKT et la voie ERK-MAPK.

Ainsi, quand ces intégrines sont mises en contact avec le collagène, celles-ci activent des processus cellulaires sous-jacents.

Le collagène peut donc participer au processus de survie cellulaire et est en plus capable d'inhiber l'apoptose cellulaire proportionnellement à sa concentration. En effet, la concentration croissante de collagène serait un facteur activateur d'autant plus efficace que sa densité est importante.

En nous situant dans le contexte du foie, l'accumulation de MEC, riche en collagène de type I, permettrait donc un maintien du cycle cellulaire et de l'activité métabolique hépatocytaire en cas de stress. Si c'est le cas, il s'agit alors d'une lame à deux tranchants, permettant d'un côté un maintien de la vitalité des hépatocytes, mais favorisant en contrepartie la chronicité de l'infection virale ainsi que la désorganisation tissulaire du parenchyme hépatique, et diminuant sa fonctionnalité.

Il semble alors que la survie des hépatocytes soit le premier objectif de l'apparition de la fibrose. Celle-ci étant réversible¹¹⁹, il vaudrait mieux réduire la fonctionnalité du foie jusqu'à ce que l'insulte soit résorbée et, en contrepartie, maintenir les hépatocytes en vie en les stimulant et donc en accroissant la concentration hépatique de collagène de type I.

B. L'action du VHC et de la fibrose sur le métabolisme hépatocytaire

Chez les foies humains tout comme chez les foies murins, l'induction d'une fibrose suite à une insulte chronique induit clairement des modifications des activités des AST et ALT hépatiques et hépatocytaires (Figure 21, Figure 25 & Figure 23). En règle générale, la réponse à l'apparition de fibrose hépatique se caractérise par une augmentation de l'AST ou une diminution de l'ALT, qui, combinées, sont responsables de l'augmentation du ratio AST/ALT sérique des patients affectés par une fibrose.

Considérant que les AST et ALT sont des enzymes dont les métabolites essentiels sont l'aspartate et l'alanine respectivement, nous supposons que les besoins métaboliques hépatocytaires sont modifiés par la présence d'une forme de fibrose, et que ces modifications soient la conséquence d'une adaptation à l'environnement hépatocytaire. En observant les concentrations d'acides aminés, on constate une tendance à l'augmentation des concentrations de différents acides aminés au sein des hépatocytes. Par la suite, il faudra peut-être considérer qu'il existe effectivement une modification du métabolisme hépatocytaire, mais que cette modification n'est pas susceptible de ne toucher que l'AST et l'ALT. En effet, si le ratio AST/ALT révèle bien de telles modifications, il serait intéressant de considérer l'intégralité des voies de synthèse des acides aminés dont les concentrations intra-hépatocytaires semblent affectées. Enfin, comme le foie est capable de métaboliser ces acides aminés pour faire fonctionner le cycle de Krebs, il sera d'un grand intérêt de considérer une étude de ce cycle en présence ou non de collagène.

Nous pensons donc que la fibrose qui apparaît au sein de foies infectés par le VHC ou même, plus simplement, exposés de façon chronique à des insultes, a une fonction d'activation du métabolisme des hépatocytes qui se traduit peut-être par une résistance accrue à l'insulte. Cela expliquerait non seulement la résistance à l'apoptose induite par la présence du collagène, mais aussi les modulations des activités AST et ALT, reflets d'une possible adaptation métabolique destinée à augmenter les chances de survie des hépatocytes infectés par le VHC ou plus simplement exposés à une insulte à caractère chronique.

V. Conclusion

A. La fibrose hépatique

La fibrose peut certes désorganiser la structure du foie et diminuer la fonctionnalité hépatique, mais semble cependant jouer un rôle prépondérant dans la survie des hépatocytes quand ceux-ci sont soumis à un stress pro-apoptotique.

De plus, le VHC pourrait également profiter de cette réponse pro-fibrotique. En effet, si la fibrose semble être un processus qui protège les hépatocytes en stimulant leur métabolisme, le VHC pourrait justement en tirer parti, car une augmentation de la fibrose hépatique pourrait amplifier la stimulation des voies d'activation du cycle cellulaire et promouvoir la survie des hépatocytes infectés.

Le VHC serait donc capable, pour assurer la survie de ses cellules hôtes 1) d'induire la fibrose, ce qui stimule la voie ERK-MAPK, et par conséquent la survie des hépatocytes, tout en les protégeant d'autres insultes, 2) d'activer directement et constitutivement la voie ERK-MAPK, et 3) d'inhiber la réponse de la PKR, et ainsi de bloquer la synthèse d'interféron α , inhibant la voie de l'induction apoptotique.

L'induction directe et indirecte de la fibrose serait donc une autre façon d'assurer la survie du VHC.

À l'heure actuelle, de nombreuses recherches sont en cours pour lutter contre la fibrose, que toute la communauté scientifique reconnaît pour son aspect néfaste et pathologique. En ce qui nous concerne, nous croyons au contraire que la fibrose sert à protéger les hépatocytes soumis à un stress, même si elle semble être un des facteurs favorisant la survie du VHC.

B. Le stress hépatocytaire et son métabolisme

Concernant le métabolisme hépatique, il apparaît évident que celui-ci est modifié et par la fibrose et par le VHC. Les raisons précises ne sont pas connues, mais elles répondent très certainement à un besoin des hépatocytes soumis à un stress de s'adapter à leur

environnement extra-et intracellulaire. En effet, l'accumulation de MEC réduit les échanges moléculaires entre le compartiment sanguin et les hépatocytes. Le stress en résultant semblerait être la cause majeure des modifications métaboliques que nous avons pu observer, observations remarquables dans l'étude des ratios AS/LT sériques des patients.

Ainsi, si la concentration d'ALT intra-cellulaire diminue, cela pourrait être la conséquence d'une diminution des échanges en acides aminés depuis le compartiment sanguin vers les hépatocytes. Cela révélerait un désordre métabolique qui pourrait être bien plus important que ce qu'illustrent l'AST et l'ALT intracellulaires.

Ces implications sont intéressantes, car la connaissance des fonctionnements métaboliques des hépatocytes soumis à de tels stress permettrait la mise au point de tests non invasifs qui autoriserait à leur tour de connaître en temps réel la progression de l'hépatopathie et de la fibrose, et surtout de pouvoir cibler de façon bien plus précise les traitements qui s'imposeraient.

C. Perspectives

Comme nous l'avons vu, le collagène joue un rôle prépondérant dans le métabolisme du foie soumis à une insulte de type inflammatoire. Cependant, de nombreux travaux complémentaires peuvent être entrepris sur les différents aspects étudiés ici.

1. Perspectives à court terme et compléments d'études.

Pour commencer, l'étude portant sur la résistance à l'apoptose des lignées, principalement la lignée 9-13, souffre de l'absence d'un réplicon ne codant pas les protéines virales. Par ailleurs, l'absence de réplicon dans la lignée Tx ne permet pas d'expliquer le non-retour à un pourcentage d'apoptose comparable à celui présenté par les Huh7. Il est probable que les Tx portent encore des caractéristiques propres au virus (ou induite par ce dernier) permettant une résistance à l'apoptose, amoindrie mais encore présente. En outre, la capacité des Tx à survivre (tout en ayant leur croissance bloquée, données non montrées) en milieu additionné de généticine[®], alors que le réplicon n'est pas

délectable par Real-Time PCR, pose un problème non négligeable. Cependant, conscient que le modèle utilisé reste incomplet, une prochaine étape consisterait à vérifier ces observations en utilisant un modèle de réplication intégral du génome du VHC tel le modèle JFH-1¹¹⁶.

Enfin, des études protéomiques (surtout d'interactions protéine-protéine) permettraient d'éclairer les voies impliquées dans la survie cellulaire quand les hépatocytes sont infectés par le VHC. Par la même occasion, comme les patients infectés par le VHC et ayant développé une fibrose sont prédisposés au développement d'hépatocarcinome, il serait possible de voir quelles pourraient être les interactions entre les protéines virales et certains proto-oncogènes cellulaires ou certaines protéines responsables de l'inflammation, et d'évaluer le degré d'activation desdites protéines par les protéines du VHC.

2. Perspectives à moyen et long terme

La grande majorité de la littérature traite de la corrélation entre la fibrose et le ratio AS/LT sans qu'il n'y ait aucun lien établi de cause à effet direct. Bien que nous ayons pu avancer quelques hypothèses relatives à la provenance des modulations de ce ratio, les voies physiologico-chimiques des modifications de ce ratio n'ont pu être établies avec précision. S'il existe bien une corrélation entre le degré de fibrose et le ratio AS/LT, il serait d'un grand intérêt d'étudier les potentielles voies impliquées. Une expérience intéressante consisterait à vérifier s'il existe une corrélation entre le degré d'inflammation et la synthèse de collagène, et ensuite de vérifier si la synthèse de collagène jouerait un rôle protecteur contre l'inflammation. Une autre expérience, similaire, consisterait à étudier l'influence de l'inflammation sur le ratio AS/LT. Peut-être même qu'il serait possible de conjuguer les deux expériences. Les résultats obtenus permettraient probablement d'éclairer quels sont les réelles origines de l'élévation de ce ratio. À défaut, d'autres voies seront à explorer.

À plus long terme, il sera intéressant de considérer le fait que les modifications observées du ratio AS/LT engendrées par la fibrose et/ou l'inflammation pourraient être la

conséquence d'une adaptation métabolique des besoins enzymatiques des AST et ALT. Par ailleurs, le cycle de Krebs étant le point de départ de la synthèse de nombreux acides aminés, l'étude de son activité pourrait fournir un point de corrélation avec la concentration des AST et ALT. Il s'avèrerait donc très utile de mettre au point et de réaliser des expérimentations de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) avec des composants marqués (au carbone 13 par exemple) ou non (Azote et groupement amine) pour voir comment évolueraient non seulement les concentrations des composés entrant dans les réactions catalysées par les AST et ALT, mais aussi de voir quelles sont les voies activées par ces modifications métaboliques imputables à la fibrose et/ou à l'inflammation.

VI. Bibliographie et références

1. Erlinger, J.-P.B.S. *Maladies du foie et des voies biliaires*, Edn. Médecine-Sciences Flammarion. (2000).
2. Iwakiri, Y. & Groszmann, R.J. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *Journal of hepatology* 46, 927-934 (2007).
3. Gressner, A.M. & Bachem, M.G. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Seminars in liver disease* 10, 30-46 (1990).
4. Hahn, E., Wick, G., Pencev, D. & Timpl, R. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 21, 63-71 (1980).
5. Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A.L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 26, 1175-1186 (2006).
6. Gujral, J.S., Liu, J., Farhood, A. & Jaeschke, H. Reduced oncotic necrosis in Fas receptor-deficient C57BL/6J-lpr mice after bile duct ligation. *Hepatology (Baltimore, Md)* 40, 998-1007 (2004).
7. Musso, O. *et al.* Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology (Baltimore, Md)* 28, 98-107 (1998).
8. Ueno, Y., Moriyama, M., Uchida, T. & Arakawa, Y. Irregular regeneration of hepatocytes is an important factor in the hepatocarcinogenesis of liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)* 33, 357-362 (2001).
9. Wang, X.D. Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling. *Nutrition reviews* 57, 51-59 (1999).
10. Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J. & Bissell, D.M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 8681-8685 (1985).
11. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43, S54-62 (2006).
12. Rooney, P.H., Telfer, C., McFadyen, M.C., Melvin, W.T. & Murray, G.I. The role of cytochrome P450 in cytotoxic bioactivation: future therapeutic directions. *Current cancer drug targets* 4, 257-265 (2004).

13. Gressner, A.M. & Ramadori, G. *Molecular and cell biology of liver fibrogenesis : proceedings of the International Falk Symposium held in Marburg, Germany, 22-23 January 1992.* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston; 1992).
14. Martinez-Hernandez, A. & Amenta, P.S. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Archiv* 423, 1-11 (1993).
15. Hamilton, G.A. *et al.* Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell and tissue research* 306, 85-99 (2001).
16. Rojkind, M., Giambone, M.A. & Biempica, L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 76, 710-719 (1979).
17. Khuroo, M.S., Khuroo, M.S. & Farahat, K.L. Molecular adsorbent recirculating system for acute and acute-on-chronic liver failure: a meta-analysis. *Liver Transpl* 10, 1099-1106 (2004).
18. Clement, B., Grimaud, J.A., Campion, J.P., Deugnier, Y. & Guillouzo, A. Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. *Hepatology (Baltimore, Md)* 6, 225-234 (1986).
19. Rescan, P.Y. *et al.* Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocyte culture. *The American journal of pathology* 142, 199-208 (1993).
20. Breitkopf, K. *et al.* Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor beta effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut* 54, 673-681 (2005).
21. Benyon, R.C., Iredale, J.P., Goddard, S., Winwood, P.J. & Arthur, M.J. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 110, 821-831 (1996).
22. Arthur, M.J., Iredale, J.P. & Mann, D.A. Tissue inhibitors of metalloproteinases: role in liver fibrosis and alcoholic liver disease. *Alcoholism, clinical and experimental research* 23, 940-943 (1999).
23. Hammel, P. *et al.* Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *The New England journal of medicine* 344, 418-423 (2001).
24. Arthur, M.J. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 122, 1525-1528 (2002).

25. Iredale, J.P. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Seminars in liver disease* 21, 427-436 (2001).
26. Blomhoff, R. & Wake, K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important rôles in retinol metabolism and fibrosis. *Faseb J* 5, 271-277 (1991).
27. Kawada, N. The hepatic perisinusoidal stellate cell. *Histology and histopathology* 12, 1069-1080 (1997).
28. Reeves, H.L. & Friedman, S.L. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 7, d808-826 (2002).
29. Gressner, A.M. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney international* 54, S39-45 (1996).
30. Iredale, J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of clinical investigation* 117, 539-548 (2007).
31. Gressner, A.M. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *Journal of hepatology* 22, 28-36 (1995).
32. Nieto, N., Friedman, S.L. & Cederbaum, A.I. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 9853-9864 (2002).
33. Nieto, N., Friedman, S.L. & Cederbaum, A.I. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology (Baltimore, Md)* 35, 62-73 (2002).
34. Nieto, N., Friedman, S.L., Greenwel, P. & Cederbaum, A.I. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* 30, 987-996 (1999).
35. Svegliati Baroni, G. *et al.* Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* 27, 720-726 (1998).
36. Friedman, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *The Journal of biological chemistry* 275, 2247-2250 (2000).
37. Schuppan, D., Krebs, A., Bauer, M. & Hahn, E.G. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell death and differentiation* 10 Suppl 1, S59-67 (2003).

38. Bissell, D.M., Roulot, D. & George, J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology (Baltimore, Md)* 34, 859-867 (2001).
39. Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K. & Dooley, S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7, d793-807 (2002).
40. Olaso, E. & Friedman, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *Journal of hepatology* 29, 836-847 (1998).
41. Bataller, R. & Brenner, D.A. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 115, 209-218 (2005).
42. Morrison, S.J., White, P.M., Zock, C. & Anderson, D.J. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96, 737-749 (1999).
43. Friedman, S.L. Hepatic stellate cells. *Progress in liver diseases* 14, 101-130 (1996).
44. Lindquist, J.N., Parsons, C.J., Stefanovic, B. & Brenner, D.A. Regulation of alpha1(I) collagen messenger RNA decay by interactions with alphaCP at the 3'-untranslated region. *The Journal of biological chemistry* 279, 23822-23829 (2004).
45. Stefanovic, B., Hellerbrand, C. & Brenner, D.A. Regulatory role of the conserved stem-loop structure at the 5' end of collagen alpha1(I) mRNA. *Molecular and cellular biology* 19, 4334-4342 (1999).
46. Ishak, K. *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology* 22, 696-699 (1995).
47. Kushner, I. The phenomenon of the acute phase response. *Annals of the New York Academy of Sciences* 389, 39-48 (1982).
48. Schuftan, G.G. & Bachem, M.G. Alpha2-macroglobulin reduces paracrine- and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultured rat hepatic stellate cells. *European journal of clinical investigation* 29, 519-528 (1999).
49. Kawser, C.A., Iredale, J.P., Winwood, P.J. & Arthur, M.J. Rat hepatic stellate cell expression of alpha2-macroglobulin is a feature of cellular activation: implications for matrix remodelling in hepatic fibrosis. *Clin Sci (Lond)* 95, 179-186 (1998).
50. Rockey, D.C. & Bissell, D.M. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43, S113-120 (2006).

51. Sala, M. *et al.* High pathological risk of recurrence after surgical resection for hepatocellular carcinoma: an indication for salvage liver transplantation. *Liver Transpl* 10, 1294-1300 (2004).
52. Bhattacharjee, A. & Bansal, M. Collagen structure: the Madras triple helix and the current scenario. *IUBMB life* 57, 161-172 (2005).
53. Asselah, T. *et al.* Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 129, 2064-2075 (2005).
54. Bieche, I. *et al.* Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* 332, 130-144 (2005).
55. Boers, W. *et al.* Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 281, 16289-16295 (2006).
56. Halfon, P., Bourliere, M., Penaranda, G. & Cacoub, P. [Serum markers of non-invasive fibrosis in chronic hepatitis C virus infection]. *La Revue de medecine interne / fondee ..* 27, 751-761 (2006).
57. Wai, C.T. *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* 38, 518-526 (2003).
58. Halfon, P. *et al.* A prospective assessment of the inter-laboratory variability of biochemical markers of fibrosis (FibroTest) and activity (ActiTest) in patients with chronic liver disease. *Comp Hepatol* 1, 3 (2002).
59. Leroy, V. *et al.* Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 46, 775-782 (2007).
60. Halfon, P. *et al.* Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 46, 395-402 (2007).
61. Cales, P. *et al.* A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 42, 1373-1381 (2005).
62. Giannini, E. *et al.* Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Archives of internal medicine* 163, 218-224 (2003).

63. Giannini, E. *et al.* Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio. *Digestive diseases and sciences* 44, 1249-1253 (1999).
64. Reedy, D.W., Loo, A.T. & Levine, R.A. AST/ALT ratio $>$ or $=$ 1 is not diagnostic of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Digestive diseases and sciences* 43, 2156-2159 (1998).
65. Imperiale, T.F., Said, A.T., Cummings, O.W. & Born, L.J. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. *The American journal of gastroenterology* 95, 2328-2332 (2000).
66. Sheth, S.G., Flamm, S.L., Gordon, F.D. & Chopra, S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *The American journal of gastroenterology* 93, 44-48 (1998).
67. Utsunomiya, T. *et al.* A gene-expression signature can quantify the degree of hepatic fibrosis in the rat. *Journal of hepatology* 41, 399-406 (2004).
68. Teare, J.P. *et al.* Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet* 342, 895-898 (1993).
69. Naveau, S., Poynard, T., Benattar, C., Bedossa, P. & Chaput, J.C. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. Diagnostic interest. *Digestive diseases and sciences* 39, 2426-2432 (1994).
70. Ziol, M. *et al.* Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* 41, 48-54 (2005).
71. Rosenberg, W.M. *et al.* Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 127, 1704-1713 (2004).
72. Vallet-Pichard, A. *et al.* FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology (Baltimore, Md)* (2007).
73. Utsunomiya, T. *et al.* A specific gene-expression signature quantifies the degree of hepatic fibrosis in patients with chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 13, 383-390 (2007).
74. Kettaneh, A. *et al.* Features associated with success rate and performance of FibroScan measurements for the diagnosis of cirrhosis in HCV patients: a prospective study of 935 patients. *Journal of hepatology* 46, 628-634 (2007).

75. Purcell, R.H., Alter, H.J. & Dienstag, J.L. Non-A, non-B hepatitis. 1976. *The Yale journal of biology and medicine* 73, 175-182 (2000).
76. Choo, Q.L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science (New York, N.Y)* 244, 359-362 (1989).
77. Giannini, C. & Brechot, C. Hepatitis C virus biology. *Cell death and differentiation* 10 Suppl 1, S27-38 (2003).
78. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *Journal of viral hepatitis* 6, 35-47 (1999).
79. Simmonds, P. *et al.* A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology (Baltimore, Md)* 19, 1321-1324 (1994).
80. Sato, Y. *et al.* Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut* 55, 1801-1808 (2006).
81. Choi, S.H. *et al.* Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular I kappa B kinase. *Molecular and cellular biology* 26, 3048-3059 (2006).
82. Zhao, L.J. *et al.* Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Experimental cell research* 305, 23-32 (2005).
83. Feng, D.Y., Sun, Y., Cheng, R.X., Ouyang, X.M. & Zheng, H. Effect of hepatitis C virus nonstructural protein NS3 on proliferation and MAPK phosphorylation of normal hepatocyte line. *World J Gastroenterol* 11, 2157-2161 (2005).
84. Macdonald, A. *et al.* The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *The Journal of biological chemistry* 278, 17775-17784 (2003).
85. Erhardt, A., Hassan, M., Heintges, T. & Haussinger, D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 292, 272-284 (2002).
86. Hayashi, J. *et al.* Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology (Baltimore, Md)* 32, 958-961 (2000).

87. Panteva, M., Korkaya, H. & Jameel, S. Hepatitis viruses and the MAPK pathway: is this a survival strategy? *Virus research* 92, 131-140 (2003).
88. Giambartolomei, S., Covone, F., Levrero, M. & Balsano, C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 20, 2606-2610 (2001).
89. Zhao, L.J. *et al.* Up-regulation of ERK and p38 MAPK signaling pathways by hepatitis C virus E2 envelope protein in human T lymphoma cell line. *Journal of leukocyte biology* 80, 424-432 (2006).
90. Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T. & Shimotohno, K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *Journal of virology* 73, 4713-4720 (1999).
91. He, Y. *et al.* Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of virology* 76, 9207-9217 (2002).
92. Gong, G., Waris, G., Tanveer, R. & Siddiqui, A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9599-9604 (2001).
93. Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N. & Lai, M.M. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science (New York, N.Y)* 285, 107-110 (1999).
94. Vyas, J., Elia, A. & Clemens, M.J. Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. *RNA (New York, N.Y)* 9, 858-870 (2003).
95. Borowski, P. *et al.* Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *The Journal of biological chemistry* 274, 30722-30728 (1999).
96. Yan, X.B. *et al.* Mapping of the interacting domains of hepatitis C virus core protein and the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. *Virus research* 125, 79-87 (2007).
97. Ukai, K. *et al.* Mutations in carboxy-terminal part of E2 including PKR/eIF2alpha phosphorylation homology domain and interferon sensitivity determining region of nonstructural 5A of hepatitis C virus 1b: their correlation with response to interferon monotherapy and viral load. *World J Gastroenterol* 12, 3722-3728 (2006).

98. Pflugheber, J. *et al.* Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4650-4655 (2002).
99. De Mitri, M.S. *et al.* Prevalence of wild-type in NS5A-PKR protein kinase binding domain in HCV-related hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 36, 116-122 (2002).
100. Di Bisceglie, A.M., Simpson, L.H., Lotze, M.T. & Hoofnagle, J.H. Development of hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease due to hepatitis C viral infection. *Journal of clinical gastroenterology* 19, 222-226 (1994).
101. White, D.J., Puranen, S., Johnson, M.S. & Heino, J. The collagen receptor subfamily of the integrins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 1405-1410 (2004).
102. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254 (1976).
103. Guguen C, G.A., Boissard M, Le Cam A, and Bourel M. Ultrastructural study of monolayer hepatocytes in adult rat cultures in the presence of hydrocortisone hemisuccinate. *Biol Gastroenterol* 8, 8 (1975).
104. Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* 42, 3858-3863 (1982).
105. Lohmann, V. *et al.* Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science (New York, N.Y)* 285, 110-113 (1999).
106. Bartenschlager, R. In vitro models for hepatitis C. *Virus research* 82, 25-32 (2002).
107. Lee, S.H. *et al.* E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. *J Immunol* 175, 8226-8235 (2005).
108. Girish, V. & Vijayalakshmi, A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian journal of cancer* 41, 47 (2004).
109. Bursch, W., Taper, H.S., Lauer, B. & Schulte-Hermann, R. Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 50, 153-166 (1985).

110. Fukuda, K. *et al.* Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology (Baltimore, Md)* 33, 159-165 (2001).
111. Ribrag V., R.É. Galénique, la dimension temps dans l'administration du médicament : le cas des agents anticancéreux. *Médecine/Sciences* 16, 513-518 (2000).
112. Nakamura, M. *et al.* Role of the Fas/FasL pathway in combination therapy with interferon-alpha and fluorouracil against hepatocellular carcinoma in vitro. *Journal of hepatology* 46, 77-88 (2007).
113. Calvisi, D.F. *et al.* Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 130, 1117-1128 (2006).
114. Knodell, R.G. *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1, 431-435 (1981).
115. Constandinou, C., Henderson, N. & Iredale, J.P. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods in molecular medicine* 117, 237-250 (2005).
116. Wakita, T. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine* 11, 791-796 (2005).
117. Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (New York, N.Y)* 238, 491-497 (1987).
118. Hehlhans, S., Haase, M. & Cordes, N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1775, 163-180 (2007).
119. Okazaki, I., Watanabe, T., Hozawa, S., Arai, M. & Maruyama, K. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *Journal of gastroenterology and hepatology* 15 Suppl, D26-32 (2000).