



**HAL**  
open science

# Évaluation de la réponse lymphocytaire T périphérique au cours de l'hépatite virale chronique C traitée par interféron alpha

Vincent Leroy

► **To cite this version:**

Vincent Leroy. Évaluation de la réponse lymphocytaire T périphérique au cours de l'hépatite virale chronique C traitée par interféron alpha. Médecine humaine et pathologie. 1998. dumas-01479066

**HAL Id: dumas-01479066**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01479066>**

Submitted on 28 Feb 2017

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1 ex employé

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

Année 1998

N° D'ORDRE: 5080

**ÉVALUATION DE LA RÉPONSE LYMPHOCYTAIRE T  
PÉRIPHÉRIQUE AU COURS DE L'HÉPATITE VIRALE  
CHRONIQUE C TRAITÉE PAR INTERFÉRON ALPHA**

**THESE**

présentée pour l'obtention du Doctorat en Médecine  
Diplôme d'État

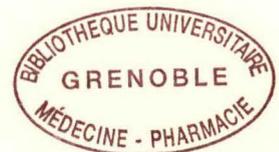
par

**Vincent LEROY**

*[Données à caractère personnel]*

**Thèse soutenue publiquement le 30 octobre à 14 heures  
devant le jury composé de:**

Monsieur le Professeur **J FOURNET**,      **Président du jury**  
Monsieur le Professeur **JC BENSA**  
Monsieur le Professeur **JP ZARSKI**  
Monsieur le Docteur    **P MARCHE**  
Madame le Docteur    **MC JACOB**



**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

Année 1998

N° D'ORDRE:

**ÉVALUATION DE LA RÉPONSE LYMPHOCYTAIRE T  
PÉRIPHÉRIQUE AU COURS DE L'HÉPATITE VIRALE  
CHRONIQUE C TRAITÉE PAR INTERFÉRON ALPHA**

**THESE**

présentée pour l'obtention du Doctorat en Médecine  
Diplôme d'État

par

**Vincent LEROY**

*[Données à caractère personnel]*

**Thèse soutenue publiquement le 30 octobre à 14 heures  
devant le jury composé de:**

Monsieur le Professeur **J FOURNET**,      **Président du jury**  
Monsieur le Professeur **JC BENSA**  
Monsieur le Professeur **JP ZARSKI**  
Monsieur le Docteur    **P MARCHE**  
Madame le Docteur    **MC JACOB**

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
**FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté  
 Vice-Doyen  
 Assesseurs

M. le Professeur J. L. DEBRU  
 M. le Professeur A. HADJIAN  
 M. le Professeur B. RAPHAEL  
 M. le Professeur J.P. ROMANET  
 M. le Professeur B. SELE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

MM.			HALIMI	Serge	Nutrition
AMBLARD	Pierre	Dermato. Vénérologie	HOMMEL	Marc	Neurologie.
AMBROISE-THOMAS	Pierre	Parasitologie et Mycol.	HOSTEIN	Jean	Hépto-Gastro-Entérol.
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques et	JUVIN	Robert	Rhumatologie
		Informatique Méd.	JOUK	Pierre-Simon	Biologie du Dévelop. et de la
BACHELOT	Ivan	Endocrinologie et			reproduction.
		Maladies Métaboliques	LE BAS	François	Biophys. et Trait. de l'Image.
BARGE	Michel	Neurochirurgie	LEBEAU	Jacques	Stomat. et Chirurgie Maxillo-
BARRET	Luc	Médecine Légale			Faciale
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et Imag. Méd.	LEROUX	Dominique	Génétique
BEANI	J.-Claude	Dermatologie, Vénérologie	LETOUBLON	Christian	Chirurgie Générale
BENABID	Al.-Louis	Biophys. et Trait. de l'image	LEVERVE	Xavier	Thérapeutique
BENSA	J. Claude	Immunologie	LEVY	Patrick	Physiologie
BERNARD	Pierre	Gynéco et Obstétrique	LUNARDI	Joël	Biochimie et Bio. Molécul.
BESSARD	Germain	Pharma. Fondamentale	MACHECOURT	Jacques	Cardio. et Maladie Vascul.
BLIN	Dominique	Chir. Thor. et Cardio Vascul.	MAGNE	Jean-Luc	Chir. Vasculaire
BOLLA	Michel	Radiothérapie	MALLION	J. Michel	Méd. du Trav. et Risques Prof.
BOST	Michel	Pédiatrie	MASSOT	Christian	Médecine Interne
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes	MERLOZ	Philippe	Chir. Ortho. et Traumatol.
BOUCHARLAT	Jacques	Pédo Psychiatrie	MOREL	Françoise	Bioch. et Biol. Moléculaire
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie	MICLOUD	Max	Maladies Infect. et Trop.
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et Cyto. Pathol.	MOUILLON	Michel	Ophthalmologie
BRICHON	P.Yves	Chir. Thor. et Cardio.Vasc.	MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique	MOUTET	François	Chir. Plast.Reconst. et Esth.
CARPENTIER	Patrick	Méd. Interne	PASQUIER	Basile	Anat. et Cyto.Pathol
CHAMBAZ	Edmond	Biologie Cellulaire	PASSAGIA	J.-Guy	Anatomie.
CHARACHON	Robert	O.R.L.	PAYEN de LA		
CHIROSSSEL	J. Paul	Anatomie	GARANDERIE	J. François	Anesthésiologie
CINQUIN	Philippe	Biostatistique et Inf. Méd.	PELLAT	Jacques	Neurologie
COLOMB	Maurice	Immunologie	PHELIP	Xavier	Rhumatologie
COMET	Michel	Biophys. et Trait. de l'image	PISON	Christophe	Pneumologie
CORDONNIER	Daniel	Néphrologie	POLACK	Benoît	Hématologie
COULOMB	Max	Radiologie et Imagerie Méd.	POLLAK	Pierre	Neurologie
CROUZET	Guy	Radiologie et Imagerie Méd.	PONS	Jean-Claude	Gynécologie et Obstétrique
DEBRU	Jean-Luc	Médecine Interne	RAMBAUD	Pierre	Pédiatrie
DE GAUDEMARIS	Régis	Méd. du Trav. et des risques professionnels.	RAMBEAUD	J. Jacques	Urologie
			RAPHAEL	Bernard	Stomato. et Chirurgie
DEMONGEOT	Jacques	Biostatistique et Inf. Méd.			Maxillo-faciale
DENIS	Bernard	Cardio. et Malad. Vascul.	REYT	Emile	O.R.L.
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie	ROMANET	J. Paul	Ophthalmologie
DUPRE	Alain	Chirurgie Générale	SARAGAGLIA	Dominique	Chir. Orthopédique
DYON	J. François	Chirurgie Infantile			et Traumatologique
FAGRET	Daniel	Bioph. et Trait. Image	SCHAERER	René	Cancérologie
FAURE	Claude	Anatomie	SEIGNEURIN	Daniel	Histo.embryo.cytogénét.
FAVROT	Marie C.	Cancerologie CLB Lyon			Reproduction
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie	SEIGNEURIN	J. Marie	Bactério-Viro - Hygiène.
FOURNET	Jacques	Hépto-Gastro-Entéro.	SELE	Bernard	Biologie du Développement
FRANCO	Alain	Médecine. Interne			et de la Reproduction
FRANCOIS	Patrice	Épidém., Écon. de la Sant. et Prévention.	SOTTO	J. Jacques	Hématologie et Transfusion
			STAHL	J. Paul	Maladies Infect. et Trop.
GARNIER	Philippe	Pédiatrie	VIALTEL	Paul	Néphrologie
GIRARDET	Pierre	Anesthé. et Réa. Chir.	VROUSOS	Constantin	Radiothérapie
GOULLIER	Andrée	Parasitologie et Mycologie	ZARSKI	J. Pierre	Hépto-Gastro-Entérol.
GUIDICELLI	Henri	Chirurgie Vasculaire			
GUIGNIER	Michel	Réanimation Médicale			
HADJIAN	A.-Jean	Biochimie et biol.Mol			

A Caroline et à ma fille Amandine

A mes parents qui m'ont toujours encouragé

A mes frères, Djé, Schnoux et Pups

A mes grand-parents paternels

A ma grand-mère médecin,

En souvenir de mon grand-père, le Dr R AULAGNIER

A tous mes amis.

**A notre Président de Thèse,  
Monsieur le Professeur FOURNET**

Nous le remercions de présider ce jury. Sa culture médicale et les qualités humaines dont il fait preuve avec ses patients demeurent pour nous un exemple. Nous lui témoignons notre sincère reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur BENSA**

Il nous a accueilli au sein du laboratoire d'immunologie. Son soutien a permis la réalisation de notre travail de DEA et de cette thèse. Nous lui témoignons nos plus vifs remerciements.

**A Monsieur le Professeur ZARSKI**

Son soutien constant et amical et son esprit d'initiative nous ont permis de mener à bien plusieurs travaux et de progresser dans le domaine de l'hépatologie. Nous le remercions de nous permettre de travailler à ses côtés.

**A Monsieur le Docteur MARCHE**

Nous le remercions d'avoir accepté de juger ce travail. Ses compétences en immunologie seront pour nous une aide précieuse dans les années à venir.

**A Madame le Docteur JACOB**

Elle nous a guidé tout au long de ce travail comme elle l'avait fait pour le stage de DEA. Sa disponibilité, sa constante bonne humeur et sa rigueur scientifique sont autant de qualités que nous avons pu apprécier.

A tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail, en particulier:

Monsieur le professeur COLOMB, pour son soutien et ses conseils avisés lors de nos réunions.

Monsieur le professeur SEIGNEURIN, qui nous avait accueilli au laboratoire de virologie pour le stage de maîtrise.

Maryline BAUD, qui a réalisé l'étude virologique et les cultures lymphocytaires.

Mireille FAVRE, qui nous a enseigné les bases d'utilisation d'un "FACS".

Marie-Ange THELU, pour l'analyse des quasi-espèces.

Raphaëlle BARNOUD pour l'étude histologique.

Marianne MAYNARD, qui a coordonné l'étude clinique.

L'ensemble des techniciens du laboratoire d'immuno-cytologie et des cultures de l'ETS Isère/Savoie, en particulier Christine VALET pour son aide constante pour les cultures cellulaires.

Et également Claudine GIROUX et l'ensemble du groupe "PHRC 1996"

A tous les médecins qui m'ont enseigné la clinique et l'endoscopie digestive

A l'ensemble du personnel du département d'hépto-gastro-entérologie

# **INTRODUCTION**

# 1. INTRODUCTION

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est un problème de santé publique dans le monde. La séroprévalence du VHC est estimée à 1,15 % en France, dont 81% de sujets virémiques (Dubois et al<sup>19</sup>). La principale caractéristique de l'infection par le VHC est la fréquence du passage à la chronicité, observée dans environ 70% des cas, avec un risque d'évolution vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Certains facteurs liés à l'hôte (âge, sexe, consommation d'alcool) ou au virus (génotype, quasi-espèces) pourraient influencer l'histoire naturelle de la maladie, très variable selon les individus.

Le seul traitement de l'hépatite chronique C ayant prouvé une certaine efficacité en monothérapie est l'interféron alpha (IFN $\alpha$ ). Cette efficacité est cependant limitée puisque le taux de réponse biochimique soutenue (normalisation de l'activité sérique de l'ALAT) reste inférieur 25% après un traitement de 12 mois (Poynard et al<sup>69</sup>), et est proche de 15 à 20% en terme de réponse virologique soutenue (négativation de l'ARN sérique du VHC). Les principaux facteurs prédictifs connus de réponse au traitement sont les facteurs virologiques, en particulier la charge virale et le génotype (Martinot-Peignoux et al<sup>56</sup>).

La réponse immunitaire de l'hôte joue très probablement un rôle important dans l'histoire naturelle de la maladie mais est encore peu connue. Cette réponse semble prépondérante pour obtenir l'éradication du virus après infection aiguë, mais elle pourrait également participer à la constitution des lésions hépatiques à la phase chronique de l'infection. La réponse immunitaire de l'hôte en particulier à médiation cellulaire pourrait également influencer l'efficacité du traitement par IFN $\alpha$ , qui possède des propriétés anti-virales mais aussi immunomodulatrices. L'importance respective de ces deux mécanismes n'est cependant pas connue.

Les buts de notre travail ont donc été de : 1) évaluer chez les malades atteints d'hépatite chronique C traités par IFN $\alpha$  la réponse des lymphocytes T périphériques anti-VHC, en étudiant in vitro leur activation, leur prolifération, et leur sécrétion de

cytokines en réponse à une stimulation par des protéines virales recombinantes, 2) identifier les corrélations existant entre la réponse lymphocytaire T et les caractéristiques cliniques, biochimiques, virologiques et histologiques des malades, et 3) rechercher d'éventuels paramètres de la réponse lymphocytaire T pouvant être prédictifs de la réponse au traitement par IFN $\alpha$ .

# **RAPPELS THEORIQUES**

## 2. RAPPELS THEORIQUES

### 2.1. LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC)

Le VHC a été découvert en 1989 grâce aux techniques de biologie moléculaire avant même que le virus soit vu en microscopie électronique ou cultivé *in vitro*. Il s'agit d'une particule enveloppée de la famille des Flaviviridae de 55 à 65 nm de diamètre constituée d'un ARN messager monocaténaire de polarité positive. Cet ARN messager, de 9,4 Kb, correspond à un cadre de lecture ouvert unique codant pour une polyprotéine de 3010 acides aminés. Celle-ci est secondairement clivée par des protéases cellulaires et virales pour donner naissance aux différentes protéines virales. Celles-ci peuvent être structurales (enveloppe: E1, E2/NS1, capsid: C) ou non structurales (NS2, NS3, NS4 et NS5) (Annexe 1). Le rôle de ces protéines non structurales reste encore imprécis. NS5 code pour une ARN polymérase-ARN dépendante, et NS3 code pour une hélicase et pour une sérine protéase qui clive la polyprotéine au niveau des jonctions NS3/NS4 et NS4/NS5. Le cycle de réplication virale est encore peu connu, compte-tenu de l'absence à l'heure actuelle de système de culture efficace.

La principale particularité du VHC est sa grande variabilité génomique, le taux de mutation avec la réplicase virale étant estimé à  $2.10^{-3}$  /nucléotide/an. Cette variabilité a permis de définir différents génotypes, actuellement classés de 1 à 6, l'appartenance à un même génotype nécessitant au minimum 70% d'homologie. Il existe au sein de chaque génotype un classement en sous-types lorsque l'homologie est inférieure à 80%. De plus, chez un individu donné, plusieurs sous-populations virales peuvent émerger et coexister au cours de l'infection, cet équilibre définissant une répartition virale de type "quasi-espèces". La variabilité nucléotidique touche préférentiellement certaines régions du génome, en particulier E2/NS1 (région hypervariable I) et NS5, alors que d'autres régions du génome sont très conservées (capsid, extrémité 5' non codante).

Le tropisme viral n'est pas exclusivement hépatocytaire, puisque des séquences d'ARN viral ont été détectées dans les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) du sang périphérique par PCR (Zignego et al<sup>99</sup>). Ce site pourrait constituer un réservoir de virus en particulier au cours des traitements anti-viraux.

## 2.2. HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION PAR LE VHC

L'infection par le VHC entraîne une hépatite aiguë le plus souvent asymptomatique, détectable par une hypertransaminasémie et une virémie d'apparition précoce. Plus de 70 % des sujets infectés évoluent vers la chronicité (Dibisceglie et al<sup>17</sup>). Les facteurs responsables de cette évolution soit vers la guérison, soit vers la chronicité sont encore mal connus. Plusieurs études ont suggéré que la réponse immunitaire de l'hôte était déterminante pour obtenir une éradication virale (Diepolder et al<sup>18</sup>, Tsai et al<sup>91</sup>). A la phase chronique de l'infection, le risque est alors la survenue d'une cirrhose et d'un carcinome hépatocellulaire (Alter et al<sup>2</sup>, Seef et al<sup>81</sup>). La prévalence de la cirrhose a été estimée à 20 % après 16 ans d'évolution, ce risque étant surtout connu chez les malades contaminés par transfusion sanguine (Koretz et al<sup>44</sup>). Dans l'étude de Tong et al<sup>90</sup>, le délai moyen d'apparition de la cirrhose était de 20,6 ± 10,1 ans. Certains facteurs peuvent cependant moduler le risque d'évoluer vers la cirrhose. Les facteurs virologiques tel que le génotype ou le niveau de la virémie, initialement incriminés ne jouent probablement pas de rôle majeur (Benvegnu et al<sup>4</sup>; Lau et al<sup>47</sup>). A l'inverse, les facteurs liés à l'hôte semblent déterminants. Plusieurs études récentes ont montré que 3 facteurs indépendants étaient significativement associés à un risque accru de cirrhose: un âge de contamination supérieur à 40 ans, le sexe masculin et une consommation journalière d'alcool supérieure à 50 g (Poynard et al<sup>68</sup>, Serfaty et al<sup>82</sup>). Le rôle joué par la réponse immunitaire de l'hôte pourrait être déterminant mais reste actuellement peu connu.

L'évolution vers le carcinome hépatocellulaire se fait presque exclusivement sur cirrhose préexistante. Son incidence chez les malades cirrhotiques a été estimée par les

auteurs japonais à 21 % à 5 ans, 53 % à 10 ans et 75 % à 15 ans (Ideka et al<sup>37</sup>). L'incidence annuelle du carcinome hépatocellulaire se situe en Europe entre 3 et 5 % (Serfaty et al<sup>83</sup>).

### 2.3. PHYSIOPATHOLOGIE

A la phase chronique de l'infection, deux mécanismes potentiels sont incriminés pour expliquer les lésions hépatiques liées au VHC: un mécanisme cytopathique direct du virus sur les cellules cibles et un mécanisme immunitaire humoral et cellulaire en réponse à l'agression virale. En l'absence de système de culture efficace, l'importance respective de ces deux mécanismes n'est actuellement pas connue (Gonzales-Peralta et al<sup>31</sup>). Plusieurs arguments sont en faveur d'un effet cytopathique direct du VHC, qui appartient à la famille des pestivirus, virus habituellement cytopathiques. Après transplantation hépatique, des formes d'hépatites fibrosantes cholestatiques d'évolution rapide ont été décrites, en l'absence d'infiltration lymphocytaire majeure (Schluger et al<sup>77</sup>). De même, au cours des co-infections VHC-VIH, Causse et al<sup>13</sup> ont suggéré que les lésions histologiques, en particulier la fibrose, étaient plus intenses qu'en cas d'infection virale C isolée. A l'opposé, de nombreux facteurs plaident en faveur du rôle de la réponse immunitaire dans la genèse des lésions hépatiques. Premièrement, les virus cytopathiques sont rarement responsables d'infections chroniques. Deuxièmement, il existe des patients virémiques ayant des transaminases normales et une histologie hépatique normale (Brillanti et al<sup>8</sup>). L'administration de corticoïdes entraîne de plus une diminution des transaminases associée à une augmentation de la virémie (Fong et al<sup>26</sup>). Enfin, l'intensité de l'infiltration lymphocytaire associée à une expression des molécules d'adhésion endothéliales et hépatocytaires semble corrélée à l'importance des lésions histologiques nécrotico-inflammatoires et à l'activité sérique de l'ALAT (Mosnier et al<sup>60</sup>).

Quelque soit le mécanisme initial responsable de l'atteinte hépatocytaire, l'infection par le VHC entraîne une réaction inflammatoire portale constituée

essentiellement de lymphocytes qui vont détruire la lame bordante hépatocytaire et créer des lésions de nécrose parcellaire. Ces lésions nécrotico-inflammatoires vont aboutir à la constitution d'une fibrose par rupture de l'équilibre dynamique entre fibrogénèse et fibrinolyse. L'infection de l'hépatocyte ou de la cellule biliaire par le VHC entraîne initialement une activation des cellules de Küpfer. Celles-ci vont sécréter des cytokines comme l'IL1 et l'IFN $\gamma$ , stimulant les lymphocytes T CD4, et des facteurs de croissance comme le PDGF ou le TGF $\beta$  (Friedman<sup>27</sup>). Ces facteurs vont à leur tour stimuler des cellules quiescentes du mésenchyme notamment les lipocytes (ou cellules de Ito) et des fibroblastes portaux. Ainsi activées, ces cellules vont se transformer en myofibroblastes, à l'origine de la synthèse des molécules de la matrice extra-cellulaire. Celles-ci, produites en excès, s'organisent dans la matrice pour aboutir à la fibrose (Schuppan et al<sup>78</sup>).

## **2.4. RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTI-VIRALE C**

Au cours de l'hépatite virale C, il existe de nombreux arguments en faveur d'une importante sollicitation du système immunitaire à la fois humorale et cellulaire de l'hôte. A la phase aiguë de l'infection, celle-ci apparaît donc fondamentale pour permettre l'éradication du virus et la guérison (Diepolder et al<sup>18</sup>). En revanche, à la phase chronique, la réponse immunitaire pourrait participer à la genèse des lésions hépatiques (Napoli et al<sup>63</sup>).

### **2.4.1. Mécanismes généraux de l'immunité antivirale**

Le cycle d'un virus, parasite intra-cellulaire obligatoire, comporte une phase de dissémination humorale et une phase de réplication intra-cellulaire. Chacune de ces phases constitue une cible potentielle pour l'intervention de la réponse immunitaire de l'hôte, dont le but est l'inhibition de la propagation virale et l'élimination des cellules infectées.

### *2.4.1.1. Effecteurs de la réponse immunitaire*

Au cours de la phase initiale de dissémination humorale du virus, la réponse immunitaire de l'hôte est d'abord non spécifique, faisant intervenir le complexe d'attaque du complément, l'opsonisation du virus, et les cellules natural killer. Cette réponse non spécifique va favoriser la phagocytose des particules virales par les monocytes/macrophages, à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1, l'IL6 et le TNF $\alpha$  qui vont amplifier le phénomène. Les antigènes viraux ainsi phagocytés sont ensuite protéolysés en petits peptides d'environ 13 à 15 acides aminés, puis présentés à la surface des cellules, également appelées cellules présentatrices de l'antigène (CPA). La présentation de ces antigènes "apprêtés" s'effectue en association avec une molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Celle-ci, formée de 2 chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  fixe le peptide antigénique dans une poche formée par les replis de la molécule.

Le complexe peptide antigénique/molécule de classe II du CMH est reconnu spécifiquement par des lymphocytes T auxiliaires, de phénotype CD4. La spécificité de l'interaction est assurée par la fixation de la molécule CD4 au domaine  $\beta$ 2 des molécules HLA de classe II. Après avoir reconnu l'antigène viral, les lymphocytes T CD4 vont être activés et sécréter différentes cytokines qui vont réguler les lymphocytes B et les lymphocytes T de phénotype CD8.

Les lymphocytes B activés, transformés en plasmocytes, sont capables de produire des anticorps spécifiques dirigés contre de nombreux épitopes viraux. Les anticorps neutralisants, généralement dirigés contre les protéines d'enveloppe, jouent un rôle primordial en inhibant la pénétration du virus dans la cellule cible en l'empêchant de se fixer à son récepteur membranaire. Ils pourraient également favoriser l'agrégation des protéines virales et faciliter leur phagocytose par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (Ferrari et al<sup>24</sup>). Le virus est en revanche protégé des anticorps neutralisants dès qu'il a pénétré dans la cellule cible. Le système immunitaire

à médiation cellulaire devient alors le système de défense principal contre l'agression virale.

Les lymphocytes T CD8 ont une action cytotoxique vis à vis des cellules infectées par les virus. Celles-ci présentent à leur surface de petits peptides viraux de 8 à 10 acides aminés, synthétisés par la cellule (voie de présentation endogène) et liés à un complexe constitué d'une molécule de classe I du CMH et de la  $\beta 2$  microglobuline. L'interaction entre les lymphocytes T cytotoxiques et les molécules de classe I est due à la fixation de la molécule CD8 au domaine  $\alpha 3$  de la molécule HLA de classe I. Après fixation sur les cellules infectées, les lymphocytes T cytotoxiques libèrent différentes substances dont la perforine et les granzymes A et B, capables respectivement de provoquer la nécrose ou l'apoptose des cellules infectées; et d'autres cytokines pouvant avoir un effet direct sur la réplication virale et sur le recrutement de macrophages. Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent également induire directement l'apoptose des cellules infectées par la voie Fas/Fas Ligand (Stenger et al<sup>85</sup>).

Les cellules infectées peuvent également être recouvertes d'anticorps et être la cible des cellules natural killer (NK), celles-ci possédant des récepteurs spécifiques pour la fraction constante des immunoglobulines (phénomène de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps). Les cellules NK peuvent également lyser de manière non spécifique les cellules infectées, en particulier celles n'exprimant pas d'antigène HLA à leur surface.

#### ***2.4.1.2. Régulation. Rôle des cytokines TH1/TH2***

En 1986, Mosmann et al<sup>61</sup> ont rapporté que les clones de lymphocytes CD4 (+) pouvaient, chez la souris, être divisés en deux classes, appelées TH1 et TH2 en fonction de leur profil de sécrétion cytokinique. Les lymphocytes TH1 ont été définis par leur propriété à sécréter l'IL2, l'IFN $\gamma$ , et le TNF  $\beta$ , alors que les lymphocytes TH2 ont été définis par leur sécrétion d'IL4, d'IL5, d'IL6, d'IL10 et d'IL13. Schématiquement, la réponse TH1 est impliquée dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire et la

réaction inflammatoire, alors que la réponse TH2 entraîne une production d'immunoglobulines. Il existe une régulation de la prolifération des lymphocytes TH1 et TH2 par inhibition mutuelle par leur produits de sécrétion, l'IFN $\gamma$  inhibant sélectivement la prolifération TH2, l'IL4 et l'IL10 inhibant la prolifération TH1. L'importance de la réponse TH1 ou TH2 a été soulignée chez la souris infectée expérimentalement par *Leishmania major*, parasite intra-cellulaire (Heinzel et al<sup>33</sup>). Dans ce modèle, une réponse cytokinique TH1 était associée à une éradication du parasite, alors qu'une réponse TH2 était corrélée à une forme létale de l'infection. Le choix de la différenciation vers TH1 ou TH2 reste actuellement débattu, mais des paramètres comme la dose d'antigène inoculée, pouvant modifier l'affinité du complexe peptide/CMH II pour le récepteur du lymphocyte CD4 (+), le type de cellules présentatrices de l'antigène, et le type de chimiokines (MIP1 $\alpha$ , MCP1) ou cytokines (IL4, IL12) présentes pourraient être déterminants (Eckels et al<sup>21</sup>). Une fois déclenchée, la polarisation TH1 ou TH2 semble difficile à renverser.

Le paradigme TH1/TH2 doit cependant être interprété avec prudence, puisque chez l'homme certains lymphocytes, appelés TH0, sont capables de sécréter simultanément des combinaisons variables de cytokines du groupe TH1 et TH2. Cependant, même chez l'homme, des profils de sécrétion cytokinique TH1 ou TH2 peuvent être dégagés dans des situations cliniques diverses. En cas d'infection par des organismes intra-cellulaires (virus, parasites intra-cellulaires), le profil détecté est habituellement de type TH1, favorisant une réponse T cytotoxique et natural killer. Dans certaines infections comme la lèpre, il a été montré qu'une réponse TH1 était associée à une forme transitoire de la maladie alors qu'une réponse TH2 était corrélée à une évolution chronique (Yamamura et al<sup>96</sup>). De même, au cours de l'infection à VIH, l'apparition d'un profil TH2 précéderait l'apparition de l'immunodépression. Ces données suggèrent l'importance capitale de la réponse cytokinique initiale par les lymphocytes CD4 (+) au cours des infections.

## 2.4.2. Immunité anti-virale C

### 2.4.2.1. Réponse immunitaire humorale.

Des expériences chez le chimpanzé ont montré qu'il existait après inoculation virale une réponse humorale précoce dirigée contre les protéines structurales et non structurales du VHC. Cette réponse humorale est à la base des tests sérologiques. Cependant, aucune cinétique de réponse ne peut être définie, et aucun profil de séroconversion n'est corrélé à l'éradication du virus. Des anticorps de classe IgM ont été décrits mais ne sont pas nécessairement associés à une infection aiguë. Nagayama et al<sup>62</sup> ont suggéré que la présence d'IgM dirigés contre la capsid était associée à l'activité histologique de la maladie et disparaissaient après réponse au traitement antiviral, mais ces résultats n'ont pas été confirmés. En revanche, la présence d'anticorps dirigés contre l'enveloppe virale, en particulier E1, pourrait s'avérer importante. Mangia et al<sup>53</sup> ont récemment montré que les malades ayant une réponse soutenue à l'IFN $\alpha$  avaient des titres initiaux élevés d'anticorps anti-E1, suivis d'une diminution rapide de ces titres sous traitement. Une diminution significative du titre d'anti-E1 était également prédictive d'une réponse soutenue au traitement dans l'étude de Jeffers et al<sup>39</sup>.

Le caractère neutralisant de certains anticorps a récemment été démontré (Farci et al<sup>23</sup>). La spécificité de ces anticorps neutralisants est encore imparfaitement connue. Néanmoins, il a été suggéré que l'épitope B majeur était situé sur la partie N-terminale de la protéine d'enveloppe E2/NS1 (région HVR I) (Taniguchi et al<sup>86</sup>). L'apparition de mutations de HVR I sous la pression immunitaire pourrait favoriser l'échappement du virus à la réponse humorale, comme l'ont suggéré des expériences d'inoculation au chimpanzé (Farci et al<sup>23</sup>).

#### *2.4.2.2. Réponse immunitaire cellulaire*

Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) constituent les principaux effecteurs de défense anti-virale. Ils reconnaissent des peptides viraux présentés par la cellule infectée en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Au cours de l'infection virale C, une réponse cytotoxique a été détectée dans le foie et dans le sang périphérique (Hiroishi et al<sup>34</sup>; Koziel et al<sup>45</sup>). Plusieurs épitopes, localisés sur les protéines structurales et non structurales du VHC ont été déterminés, en particulier localisés sur NS3. Ces données suggèrent que l'infection évolue malgré la présence d'une réponse cytotoxique, qui pourrait également participer à la genèse des lésions hépatiques.

Une prolifération des lymphocytes CD4 (+) du sang périphérique a été mise en évidence en réponse à plusieurs protéines, en particulier la protéine de capside et NS3/NS4 (Botarelli et al<sup>7</sup>; Ferrari et al<sup>25</sup>). Une réponse proliférative CD4 (+) a également été déterminée à partir de lymphocytes issus de biopsies hépatiques, en particulier dirigée contre NS4 (Minutello et al<sup>57</sup>). Cependant, les épitopes reconnus par les lymphocytes hépatiques et les lymphocytes du sang périphérique étaient dans cette étude différents, suggérant une compartimentalisation lymphocytaire sur le site principal de l'infection. Le taux de lymphocytes CD4 (+) étant normal au cours de l'infection virale C, un déficit qualitatif de la réponse CD4 a été proposé pour expliquer la persistance virale. La réponse qualitative CD4 initiale dépend de l'affinité du récepteur du lymphocyte (TCR) pour le complexe peptides viraux/CMH II, et de la présence de signaux auxiliaires. Le type de la protéine HLA de classe II pourrait donc jouer un rôle à ce niveau. Certains groupes HLA, en particulier DRB1\*1101 et DQB1\*0301 semblent être plus fréquents chez les patients ayant spontanément éradiqué le virus, alors que DRB1\*0301 semble associé à une évolution chronique de l'hépatite (Höhler et al<sup>36</sup>; Alric et al<sup>1</sup>). De la stimulation lymphocytaire CD4 initiale résulte une sécrétion de différentes cytokines, impliquées dans la poursuite de la réaction

immunitaire. Une sécrétion cytokinique inappropriée pourrait favoriser la persistance virale.

#### ***2.4.2.3. Réponse cytokinique***

L'immunité de type cellulaire semblant prépondérante au cours de l'infection à VHC, l'importance de la réponse initiale des lymphocytes CD4 (+) TH1 pourrait être déterminante à la phase aiguë de l'infection. Plusieurs études récentes ont étudié le profil de sécrétion cytokinique des lymphocytes CD4 (+) du foie et du sang périphérique à la phase aiguë et chronique de l'infection. A la phase aiguë, deux études récentes (Tsai et al<sup>91</sup>; Lechman et al<sup>49</sup>) ont suggéré qu'il existait une corrélation entre la sécrétion d'IL2 et d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes CD4 (+) du sang périphérique et une évolution spontanée vers la guérison de l'hépatite. A l'inverse, la détection d'IL4 et d'IL10 était associée à une évolution vers l'hépatite chronique. Les différentes études, utilisant des méthodologies très différentes, aboutissent cependant à des résultats parfois discordants. Ainsi, à la phase chronique de l'infection, alors que certaines études retrouvent des taux sériques d'IL4 et d'IL10 élevés (Reiser et al<sup>73</sup>), d'autres études suggèrent à l'inverse qu'il existe au niveau hépatique des lymphocytes essentiellement TH1, pouvant être corrélés à la sévérité des lésions histologiques hépatiques (Napoli et al<sup>63</sup>). Malgré certains arguments, ces différentes études ne permettent pas d'associer formellement une réponse TH1 à une évolution bénigne de la maladie. Ces études soulèvent également le problème de l'interprétation des résultats lié au matériel cellulaire utilisé (lymphocytes hépatiques ou périphériques, CD4 (+) isolés, clones) et à la technique de détection utilisée (ELISA sérique ou dans les milieux de culture, RT-PCR des ARNm des cytokines).

## **2.5. TRAITEMENT PAR IFN $\alpha$ DE L'HEPATITE CHRONIQUE C**

### **2.5.1. Les interférons (IFN)**

Les IFN sont des protéines ou glycoprotéines naturelles impliquées dans la réponse antivirale et sécrétées par tous les mammifères. Les IFN sont classés selon les cellules qui les sécrètent, leur antigénicité et leur mode d'induction. Le type I comprend l'IFN $\alpha$  sécrété par les leucocytes et l'IFN $\beta$  sécrété par les fibroblastes alors que le type II recouvre l'IFN $\gamma$  sécrété par les lymphocytes activés. L'IFN $\alpha$  dont la synthèse est induite par les virus, est composé d'une vingtaine de sous-espèces. Il s'agit du premier traitement de l'hépatite C ayant fait la preuve de son efficacité, avant l'apparition de la ribavirine.

### **2.5.2 Mécanismes d'action de l'IFN $\alpha$**

L'efficacité de l'IFN $\alpha$  repose principalement sur deux types d'activité biologique. La première est une action antivirale médiée par la synthèse de protéines enzymatiques dont la 2'-5' oligo-adénylate synthétase, inhibant la traduction de l'ARNm viral (David et al<sup>16</sup>). La deuxième est une propriété immunomodulatrice comprenant une activation des lymphocytes natural killer et des macrophages, une augmentation de la cytotoxicité des lymphocytes CD8, de l'expression des antigènes de classe I, et régulant la production de certaines cytokines (Thomas et al<sup>88</sup>). Indépendamment de son activité antivirale, l'IFN $\alpha$  pourrait avoir une action antifibrosante, démontrée expérimentalement sur des fibroblastes en culture (Jimenez et al<sup>40</sup>).

### **2.5.3 Efficacité de l'IFN $\alpha$**

Trois critères de jugement sont habituellement utilisés pour évaluer l'efficacité du traitement: la réponse biochimique (normalisation de l'activité sérique de l'ALAT),

la réponse virologique (disparition de l'ARN du VHC dans le sérum par technique PCR), et la réponse histologique (diminution du score de Knodell ou de l'index METAVIR).

Prescrit à la posologie de 3 MUI trois fois par semaine pendant 6 mois, l'IFN $\alpha$  permet une normalisation complète de l'activité sérique de l'ALAT (réponse biochimique immédiate) dans environ 50% des cas (Camps et al<sup>12</sup>, Marcellin et al<sup>55</sup>). Cependant plus de la moitié des patients répondeurs rechutent à l'arrêt du traitement et seuls 18% des patients traités ont une réponse biochimique prolongée définie habituellement 6 mois après la fin du traitement (Poynard et al<sup>69</sup>). Dans cette méta-analyse, le pourcentage de réponse soutenue était de 38% si le traitement était poursuivi pendant 12 mois, durée actuellement recommandée. L'utilisation de doses plus élevées d'IFN $\alpha$  (6 MUI 3 fois par semaine) pourrait apporter un gain de l'ordre de 10% en terme de réponse soutenue, mais au prix d'effets indésirables plus fréquents.

La normalisation de l'activité sérique de l'ALAT n'est cependant associée à une négativation de la virémie que dans 60 à 80% des cas, et le pourcentage de réponse virologique soutenue se situe autour de 15 à 20% (Lin et al<sup>51</sup>; Angelini et al<sup>3</sup>). En l'absence de négativation de la virémie après 3 mois de traitement, aucune réponse virologique tardive n'est généralement observée. Les conférences de consensus française et américaine ont donc recommandé l'arrêt du traitement à 3 mois chez ces patients. Il est probablement possible d'identifier les patients non répondeurs plus précocement, après 1 mois et peut-être même 1 semaine de traitement (Gavier et al<sup>28</sup>).

La réponse soutenue étant habituellement définie par la normalisation de l'activité sérique de l'ALAT associée à la négativation de la virémie persistante 6 à 12 mois après l'arrêt du traitement, l'évolution à très long terme des patients répondeurs reste mal connue. Une étude récente a cependant montré l'absence de rechute biochimique et virologique associée à une amélioration ou une normalisation de l'histologie hépatique chez la plupart des malades après un suivi médian de 5 ans (Marcellin et al<sup>54</sup>).

Le pourcentage de patients ayant une amélioration histologique après un traitement de 12 mois est compris entre 90% et 56%, selon que la biopsie hépatique post-thérapeutique est effectuée à la fin ou 6 mois après la fin du traitement (Poynard et al<sup>69</sup>). Une deuxième méta-analyse récente portant sur l'histologie a montré qu'après traitement il existait une amélioration moyenne du score de nécrose focale de 0,72 unité Knodell, du score de nécrose périportale de 0,59, du score d'inflammation portale de 0,62 et du score de fibrose de 0,20 (Camma et al<sup>11</sup>). Néanmoins cette amélioration était limitée aux seuls patients répondeurs durables et à un moindre degré aux patients rechuteurs, et ne concernait pas les patients non répondeurs.

#### **2.5.4. Facteurs prédictifs de réponse à l'IFN $\alpha$**

De nombreux facteurs prédictifs de réponse au traitement ont été suggérés. Certains sont liés à l'hôte, comme un âge inférieur à 40 ans, une durée de portage courte, le sexe féminin, une consommation d'alcool inférieure à 20g par jour, l'absence de cholestase, de surcharge en fer, d'obésité ou de cirrhose. Les facteurs prédictifs de réponse les mieux identifiés sont cependant les facteurs virologiques. Dans une étude récente, le génotype 1 et la présence d'une charge virale initiale élevée étaient en analyse multivariée les deux seuls facteurs indépendants associés à une faible réponse au traitement (Martinot-Peignoux et al<sup>56</sup>). D'autres facteurs, comme la présence d'une hétérogénéité virale importante (nombre de quasi-espèces élevé), ou l'apparition de mutations dans la région ISDR (gène de résistance à l'IFN $\alpha$ ) pourraient également avoir une valeur pronostique péjorative (Moribe et al<sup>59</sup>, Enomoto et al<sup>22</sup>). En revanche, l'importance de la réponse immunitaire de l'hôte comme facteur prédictif de réponse au traitement n'a pas été évaluée. Celle-ci pourrait cependant s'avérer importante compte-tenu des propriétés immuno-modulatrices de l'IFN $\alpha$ .

# **MALADES ET METHODES**

### **3. MALADES ET METHODES**

#### **3.1. MALADES**

Entre le 01/01/1997 et le 01/01/1998, 20 malades (12 hommes, 8 femmes, âge moyen:  $43 \pm 13$  ans) porteurs d'une hépatite chronique C prouvée histologiquement ont été prospectivement inclus dans l'étude. Les critères d'inclusion comprenaient une sérologie anti-VHC positive par un test ELISA de troisième génération, une recherche positive de l'ARN sérique du VHC par PCR, une hypertransaminasémie (ALAT > N), et une histologie hépatique compatible avec une hépatite chronique virale C, avec ou sans cirrhose. Les critères d'exclusion étaient les suivants: âge inférieur à 18 ans, présence de l'antigène HBs ou d'anticorps anti-VIH, autre cause d'hépatopathie (alcoolique, auto-immune, métabolique), cirrhose décompensée, grossesse ou allaitement, thrombopénie < 75G/l, neutropénie < 1,5G/l, créatininémie > 120 $\mu$ mol/l, dysthyroïdie non équilibrée, diabète non équilibré, maladie cardio-vasculaire sévère, antécédents psychiatriques sévères et traitement antérieur par interféron alpha. Un consentement éclairé écrit était obtenu pour chaque malade, et l'étude a reçu l'accord du comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale (CCPPRB) de Grenoble (Annexe 2).

#### **3.2. PROTOCOLE THERAPEUTIQUE**

Tous les malades ont été traités par IFN $\alpha$  2a (Laroféron®, Roche) à la posologie de 3 MUI 3 fois par semaine pendant 12 mois selon les recommandations de l'AMM. Le suivi clinique comprenait une consultation médicale tous les 3 mois pendant le traitement et pendant une période de suivi de 6 mois. Sur le plan biologique, un hémogramme et un dosage de l'ALAT étaient effectués tous les mois, et un dosage de la TSH et des anticorps anti-thyroidiens tous les 3 mois. Un prélèvement sanguin était également réalisé tous les 3 mois, permettant d'effectuer les analyses virologiques sur les sérums (charge virale, quasi-espèces), et de recueillir les cellules mononucléées pour l'analyse immunologique. La réponse thérapeutique immédiate était définie par la

normalisation de l'ALAT associée à la négativation de l'ARN sérique du VHC par PCR après 3 mois de traitement. La non réponse était définie par l'absence de négativation de l'ARN du VHC à 3 mois, quelque soit le niveau de l'activité sérique de l'ALAT. Le traitement était dans ce cas interrompu selon les recommandations de l'AMM.

### 3.3. MARQUEURS BIOLOGIQUES DU VHC

Les anticorps anti-VHC étaient recherchés par un test ELISA de troisième génération (Ortho ou Abbott) et par un test RIBA de troisième génération (Ortho ou Abbott).

Le génotype viral était déterminé avant traitement par séquençage direct (Visible Genetics Inc). En bref, l'ARN viral était obtenu par extraction chimique à partir du sérum, transcrit en ADN complémentaire et amplifié par RT-PCR dans la région 5' non codante. Le fragment obtenu, d'une taille de 300 paires de bases et couvrant la totalité de la région 5' non codante, était séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique. Les résultats obtenus étaient comparés à une base de donnée permettant d'identifier le type viral, le sous-type et l'isolat.

L'ARN sérique du VHC était détecté quantitativement par une technique standardisée de PCR compétitive (Amplicor Monitor®, Roche Diagnostic System, Bâle, Suisse) avant le début du traitement puis tous les 3 mois pendant la durée du traitement et du suivi. En cas de PCR quantitative négative, une PCR qualitative (Amplicor®, Roche) était utilisée pour augmenter la sensibilité du test.

La détermination du nombre de quasi-espèces était effectuée avant traitement et à 3 mois selon la méthode de Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). En bref, les fragments d'ADN complémentaires obtenus après PCR dans la région HVRI étaient dénaturés par la chaleur puis refroidis brutalement, laissant les monobrinns séparés. Ces fragments d'ADN étaient soumis à une électrophorèse non dénaturante dans un gel de polyacrylamide, chaque brin se renaturant sur lui-même et prenant une conformation spécifique dépendante de sa séquence nucléotidique. Une différence dans

la migration électrophorétique pouvait être observée pour une variation de séquence de l'ordre d'une mutation ponctuelle, chaque bande visualisée sur le gel correspondant théoriquement à une séquence virale différente. La révélation était effectuée à l'aide d'une coloration de l'ADN par le nitrate d'argent.

### **3.4. HISTOLOGIE HEPATIQUE**

Une biopsie hépatique était réalisée pour tous les malades dans les 6 mois précédant le début du traitement. L'évaluation des lésions histologiques a été effectuée par un seul anatomopathologiste n'ayant pas connaissance des caractéristiques cliniques et biologiques des malades. Le score de Knodell et al<sup>43</sup>, permettant de préciser l'intensité de la nécrose hépatocytaire périportale (cotée de 1 à 10), la nécrose focale (cotée de 1 à 4), l'inflammation portale (cotée de 1 à 4) et la fibrose (cotée de 1 à 4) a été utilisé. L'index METAVIR<sup>87</sup>, plus simple mais plus reproductible, prenant en compte l'activité (lésions de nécrose, cotées de 0 à 3) et la fibrose (cotée de 0 à 4) a également été utilisé.

### **3.5. ANALYSE IMMUNOLOGIQUE**

#### **3.5.1. Antigènes recombinants du VHC**

Les antigènes de capsid (C22), des régions non structurales NS3 (33c), NS4 (c100), et NS5 ont été produits comme protéines de fusion avec la superoxyde dismutase dans des levures. Ces antigènes, dérivés d'un génotype 1a, avaient un degré de pureté supérieur à 90%. Ils ont été fournis par Chiron Corporation.

### **3.5.2. Cellules**

Les cellules mononucléées du sang périphérique des malades étaient obtenues après prélèvement de sang total (tubes Becton Dickinson) par gradient de centrifugation sur Ficoll-hypaque, puis directement congelées. Pour cela, les cellules étaient mises en suspension en milieu RPMI 1640 supplémenté en sérum A 20% à 4°C (1ml/10.10<sup>6</sup> cellules). Une solution de DMSO à 40°C en eau distillée, diluée au 1/2 en milieu RPMI supplémenté en sérum A 20% était ajoutée à 4°C, goutte à goutte, à la suspension de lymphomonocytes. Les ampoules étaient mises directement à -80°C pendant 24h, puis stockées dans l'azote liquide.

Immédiatement avant leur mise en culture, les cellules étaient décongelées de la manière suivante: les ampoules étaient plongées dans un bain-marie à 37°C. Après remise en suspension, 1ml de RPMI sérum A 20% à 37°C était ajouté goutte à goutte, puis après 10 minutes, 5 ml de RPMI sérum A 20% étaient ajoutés. Après centrifugation à 350G pendant 10 minutes, le culot cellulaire était resuspendu dans 3 ml de milieu RPMI sérum A 20% pendant 1 heure à température ambiante. Après une nouvelle centrifugation, les cellules étaient resuspendues dans du milieu de culture, numérees, et un contrôle de viabilité était effectué en microscopie optique sur cellule de Malassez après marquage au bleu trypan.

### **3.5.3 Milieu de culture**

Le milieu de culture était constitué de RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 2mM de glutamine (Boehringer), 1 mM de sodium de pyruvate (Sigma), 100 IU/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine, 1% d'acides aminés non essentiels (MEM 100X, Boehringer), et 10% de sérum ABO.

### 3.5.4. Mesure de la prolifération lymphocytaire

Pour chaque malade, les cellules mononucléées décongelées prélevées à MOJ1 et M4J1 étaient mises en culture simultanément en l'absence ou en présence des différents antigènes viraux recombinants. La culture était effectuée sur plaque de 96 puits à fond rond, à la concentration de  $10^5$  cellules/puits, suspendues dans 200 $\mu$ l de milieu. Chaque antigène viral était testé en triplicate ou en quadruplicate, à la concentration de 10 $\mu$ g/ml pour NS3, NS4, et NS5, et de 1 $\mu$ g/ml pour c22 qui était inhibiteur à des concentrations supérieures (résultats non rapportés). Une stimulation était également effectuée en triplicate en utilisant un pool des 4 protéines utilisées à la même concentration. L'antigène SOD, à la concentration de 10 $\mu$ g/ml, était utilisé comme témoin négatif, et le pokweed mitogen était utilisé comme témoin positif. Les cellules étaient alors mises en culture à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Après 6 jours de culture, les cellules étaient incubées pendant les 8 dernières heures en présence de thymidine tritiée (Amersham) (1  $\mu$ Ci/puits), puis récoltées sur bande de papier filtre. La radioactivité émise était déterminée à l'aide d'un compteur à ionisation de gaz exprimant les résultats en coups par minute (cpm). Les résultats étaient ensuite exprimés en calculant l'index de prolifération moyen (cpm puits stimulé/cpm puits contrôle). Un résultat positif était défini par un index de stimulation supérieur à 4.

### 3.5.5. Cytométrie de flux

Les lymphomonocytes étaient stimulés pendant 6 jours selon les mêmes conditions de culture avec le pool des 4 protéines virales, en utilisant 12 puits en parallèle. Après récupération, numération, et contrôle de viabilité, les cellules étaient lavées deux fois en milieu HBSS SVNN 2% (centrifugation 5 minutes à 400G). Un triple marquage membranaire simultané utilisant les anticorps monoclonaux anti-CD25 (PE cyanine 5), anti-CD8 (PE) et anti-CD4 (FITC) était réalisé par une incubation

pendant 20 minutes à 4°C, suivi de deux lavages en milieu HBSS SVNN 2%. Un contrôle négatif (témoin isotypique marqué avec les mêmes fluorochromes) était systématiquement utilisé pour déterminer les seuils de positivité.

L'acquisition des données était effectuée à l'aide d'un cytofluorimètre (FACScan, logiciel d'exploitation: LysisII, Becton Dickinson) permettant d'étudier 3 spectres d'émission (FL1: 530 ± 30 nm, FL2: 585 ± 42 nm, FL3: >650 nm), correspondant aux 3 fluorochromes FITC, PE, et PE-Cy5, respectivement. L'acquisition était effectuée sur 100 000 cellules. Les résultats étaient analysés à l'aide du logiciel Cell Quest® (Becton Dickinson). Dans un premier temps, un seuil de positivité de fluorescence était déterminé par l'analyse du témoin isotypique marqué (seuil habituellement défini pour obtenir au moins 99% de cellules négatives). Pour chaque anticorps spécifique, les résultats étaient exprimés en pourcentage de cellules positives (émettant une intensité de fluorescence supérieure au seuil). Les pourcentages suivants ont été déterminés: pourcentage de lymphocytes activés (CD25+), phénotypage CD4/CD8 des lymphocytes totaux, non activés (CD25-) et activés.

### **3.5.6. Dosage des cytokines**

Les conditions de culture étaient identiques à celles utilisées pour la cytométrie de flux. Cinq puits étaient mis en culture. Après 72h de stimulation, les surnageants de culture étaient récupérés et congelés à -80°C. Les dosages d'IL2, d'IL4, d'IFN $\gamma$  et d'IL10 étaient effectués par technique ELISA (Immunotech). En bref, il s'agissait d'une méthode de type sandwich en 2 étapes. La première étape permettait la capture de la cytokine par l'anticorps monoclonal idoïne fixé dans les puits d'une plaque de microtitration. La seconde étape permettait simultanément la liaison d'un deuxième anticorps monoclonal biotinylé au complexe anticorps de phase/antigène et la fixation d'un conjugué streptavidine-peroxydase à l'anticorps biotinylé par l'intermédiaire de la biotine. L'activité enzymatique liée était ensuite déterminée par addition d'un substrat chromogène. Pour chaque cytokine, une courbe d'étalonnage était effectuée à l'aide

d'un standard de concentration connue fourni par Immunotech. Les seuils de détection de la technique étaient respectivement de 5 pg/ml pour l'IL2, l'IL4 et l'IL10, et de 0,08 UI/ml pour l'IFN $\gamma$

### **3.6. ANALYSE STATISTIQUE**

Le test exact de Fischer a été utilisé pour la comparaison des variables qualitatives. Pour la comparaison des variables quantitatives, les tests non paramétriques de Mann-Witney et de Wilcoxon ont été utilisés. Le test de corrélation bivarié non paramétrique de Spearman a été utilisé. L'analyse multivariée a été effectuée à l'aide d'un modèle de régression logistique prenant en compte les variables significatives au moins à 15% lors de l'analyse univariée. Le seuil de significativité retenu était de 5%. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 6.0.

# RESULTATS

## 4. RESULTATS

### 4.1. CARACTÉRISTIQUES DES MALADES ET RÉPONSE AU TRAITEMENT

Les caractéristiques épidémiologiques, biochimiques, virologiques et histologiques des 20 malades inclus sont présentées sur le tableau 1. Il s'agissait de 12 hommes et de 8 femmes, âgés en moyenne de  $43 \pm 13$  ans. Un facteur de risque de contamination était retrouvé dans 85% des cas, incluant une transfusion sanguine dans 45% des cas et une toxicomanie intra-veineuse dans 40% des cas. Le génotype majoritaire était le génotype 1b, observé dans 40% des cas, le génotype 3a étant observé dans 30% des cas. Le score de Knodell moyen était de  $7,0 \pm 2,2$ , et un seul malade présentait une cirrhose avant traitement. Les caractéristiques individuelles des malades sont rapportées dans l'annexe 3.

Deux malades ont été exclus de l'étude pour non compliance, respectivement après 1 et 2 mois de traitement. Aucun effet indésirable nécessitant l'arrêt du traitement ou une diminution des doses n'a été observé. Parmi les 18 malades restants, une réponse thérapeutique immédiate définie par la normalisation de l'ALAT associée à une négativation de l'ARN du VHC par PCR après 3 mois de traitement était observée chez 10 malades (55%). Le tableau 2 présente les caractéristiques des malades répondeurs et non répondeurs. Ces derniers avaient une virémie significativement plus élevée ( $3,5 \pm 1,7.10^5$  vs  $1,2 \pm 1,2.10^5$  cop/ml,  $p < 0,002$ ), une durée de portage de l'infection plus longue ( $24,6 \pm 9,1$  vs  $15,0 \pm 4,3$  ans,  $p < 0,03$ ), et étaient plus fréquemment infectés par le génotype 1b (62% vs 20%,  $p = 0,09$ ) que les malades répondeurs. L'hétérogénéité virale estimée par le nombre de quasi-espèces (nombre de bandes estimé par la technique SSCP) n'était en revanche pas différente entre les 2 groupes de malades (médiane: 8 vs 8, ns).

**Tableau 1: Caractéristiques des malades à l'entrée dans l'étude**

	<b>Malades (n=20)</b>
<b>Age*</b> (ans)	42,6 ± 7,9 (40)
<b>Sex-ratio</b> (n,% d'hommes)	12 (60%)
<b>Transfusion</b> (n,%)	8 (40%)
<b>Toxicomanie</b> (n,%)	9 (45%)
<b>Durée de portage*</b> (ans)	18,9 ± 8,0 (16)
<b>ALAT*</b> (N)	3,2 ± 3,7 (2)
<b>Virémie*</b> (10 <sup>5</sup> copies/ml)	2,0 ± 1,9 (1,4)
<b>Génotype</b> (n,%)	
<b>1a</b>	4 (20%)
<b>1b</b>	8 (40%)
<b>2a</b>	1 (5%)
<b>3a</b>	6 (30%)
<b>4a</b>	1 (5%)
<b>Quasi-espèces**</b>	8,3 ± 2,0 (8)
<b>Score de Knodell*</b>	7,0 ± 2,2 (7)
<b>Activité Métavir *</b>	1,4 ± 0,6 (1)
<b>Fibrose Métavir *</b>	1,9 ± 1,0 (2)

\*: Résultats exprimés en moyennes, écart-types et médiane ().

\*\* : Nombre de bandes par la technique SSCP.

N: nombre de fois la limite supérieure de la normale

**Tableau 2: Caractéristiques des malades en fonction de la réponse au traitement**

	<b>Répondeurs</b> (n = 10)	<b>Non répondeurs</b> (n = 8)	<b>p</b>
<b>Age (ans)</b>	40,7 ± 7,0	46,1 ± 9,1	ns
<b>Sexe (n, % hommes)</b>	6 (60%)	6 (75%)	ns
<b>Toxicomanie IV (n,%)</b>	6 (60%)	2 (25%)	ns
<b>Transfusion (n,%)</b>	3 (30%)	5 (62,5%)	ns
<b>Durée de portage (ans)</b>	15,0 ± 4,3	24,6 ± 9,1	0,03
<b>ALAT (N)</b>	3,9 ± 4,7	3 ± 2,9	ns
<b>Virémie (10<sup>5</sup> copies/ ml)</b>	1,2 ± 1,2	3,5 ± 1,7	0,002
<b>Génotype 1b (n,%)</b>	2 (20%)	5 (62,5%)	0,09
<b>Quasi-espèces*</b>	8	8	ns
<b>Score de Knodell</b>	6,3 ± 2,5	7,9 ± 2,0	ns
<b>Activité METAVIR</b>	1,2 ± 0,4	1,5 ± 0,5	ns
<b>Fibrose METAVIR</b>	1,7 ± 1,2	2,1 ± 1,0	ns

Résultats exprimés en moyennes et en écart-types.

\*: Nombre de bandes par la technique SSCP exprimé en médiane.

N: nombre de fois la limite supérieure de la normale.

## 4.2. RÉPONSE LYMPHOPROLIFÉRATIVE

### 4.2.1 Analyse des index de stimulation

Parmi les 20 malades étudiés avant traitement, une réponse lymphoproliférative significative (définie par un index de stimulation supérieur à 4) dirigée contre au moins une protéine virale (NS3, NS4, NS5 ou C22) était observée dans 13 cas (65%). Deux malades avaient une réponse dirigée contre une seule protéine, 4 malades avaient une réponse contre 2 protéines, 5 malades contre 3 protéines et enfin 3 malades contre les 4 protéines. Les protéines virales les plus immunogènes étaient NS4 et C22, entraînant chacune une réponse lymphoproliférative chez 50% des malades. Une réponse dirigée contre NS5 était observée dans 45% des cas et contre NS3 dans 25% des cas. En termes quantitatifs, les index de stimulations moyens observés étaient de  $4,2 \pm 5,8$  pour NS3,  $8,0 \pm 14,4$  pour NS4,  $8,2 \pm 14,2$  pour NS5 et  $5,8 \pm 4,6$  pour C22. Lorsque la stimulation lymphocytaire était effectuée avec l'ensemble des protéines virales "poolées" avec la même concentration dans chaque puit de culture, une réponse proliférative significative était observée dans 75% des cas. Les index de stimulation constatés dans ces conditions de stimulation étaient hautement corrélés à la somme des index de stimulation observés avec chaque protéine utilisée isolément ( $r=0,82$ ,  $p=0,0001$ ). L'index de stimulation moyen observé dans ce cas était cependant inférieur à la somme des index de stimulation obtenus avec chacune des 4 protéines, en moyenne de 52% ( $13,7 \pm 26,7$  vs  $26,2 \pm 35,9$ ). Les index de stimulation individuels des patients sont rapportés dans l'annexe 4.

Une réponse proliférative intense (index de stimulation moyen:  $345 \pm 185$ ) était observée chez tous les malades lorsque qu'une stimulation mitogénique non spécifique était effectuée par le pokweed mitogen. L'intensité de cette réponse proliférative était dans ce cas indépendante de la réponse antigénique observée avec les protéines virales.

#### **4.2.2. Spécificité de la réponse proliférative**

Pour vérifier la spécificité antigénique de la lymphoprolifération, une stimulation avec la protéine de fusion SOD a été effectuée pour chaque patient. Une réponse positive était observée uniquement chez 2 patients, avec des index de prolifération faibles (patient 4 : 5,6; patient 11 : 4,4). Par ailleurs, 10 sujets témoins (donneurs de sang séronégatifs pour le VHC, sans facteur de risque et ayant une activité sérique de l'ALAT normale) ont également été testés dans les mêmes conditions de culture avec les mêmes antigènes viraux. Une réponse, dirigée contre NS4, a été observée uniquement chez un témoin, avec un index de stimulation égal à 4,6 (résultats non présentés).

#### **4.2.3. Corrélations avec la réponse humorale**

Des anticorps dirigés contre NS3, NS4, NS5 et C22, détectés en RIBA, étaient observés respectivement dans 89%, 100%, 72% et 100% des cas. En l'absence de réponse lymphoproliférative en culture dirigée contre un antigène viral, la présence d'anticorps dirigés contre le même antigène était observée dans 86% des cas pour NS3, 100% pour NS4, 70% pour NS5, et 100% pour C22. En revanche, lorsqu'il n'existait pas d'anticorps dirigé contre un antigène viral donné (NS3: n=2, NS5: n=5), une réponse lymphoproliférative dirigée contre le même antigène viral n'était jamais observée.

#### **4.2.4. Corrélations avec les caractéristiques des malades**

Les malades ayant une réponse proliférative dirigée contre au moins une protéine virale ont été comparés à ceux n'ayant pas de réponse proliférative (tableau 3). Aucune différence significative n'était observée pour l'ensemble des caractéristiques cliniques, biochimiques, virologiques et histologiques.

**Tableau 3: Caractéristiques des malades en fonction de la présence ou non d'une réponse lymphoproliférative dirigée contre au moins une protéine**

	Réponse proliférative (n =13)	Absence de réponse proliférative (n =7)	p
Age (ans)	42,1 ± 9,0	43,4 ± 7,2	ns
Sexe (% d'hommes)	75%	62,5%	ns
Durée portage (ans)	18,6 ± 7,9	19,3 ± 8,9	ns
Toxicomanie IV (n,%)	6 (46%)	3 (43%)	ns
Transfusion (n,%)	5 (39%)	3 (43%)	ns
ALAT (N)	4,0 ± 4,5	1,8 ± 1,0	0,09
Virémie (10 <sup>5</sup> copies/ ml)	2,2 ± 2,0	1,6 ± 1,7	ns
<b>Génotype</b>			
<b>1a</b>	1 (8%)	4(43%)	
<b>1b</b>	5 (39%)	3 (43%)	ns
<b>2a</b>	1 (8%)	0 (0%)	
<b>3a</b>	5 (39%)	1 (14%)	
<b>4a</b>	1 (8%)	0 (0%)	
<b>Quasi-espèces</b>	8	8	ns
<b>Score de Knodell</b>	6,3 ± 1,9	8,1 ± 2,5	ns
<b>Activité METAVIR</b>	1,7 ± 0,8	1,2 ± 0,5	ns
<b>Fibrose METAVIR</b>	1,8 ± 1,1	2,0 ± 1,2	ns

Résultats exprimés en moyennes et en écart-types.

\*: Nombre de bandes en technique SSCP exprimé en médiane.

N: nombre de fois la limite supérieure de la normale

Cependant, il existait une tendance en faveur d'une activité sérique de l'ALAT plus élevée chez les patients ayant une réponse proliférative ( $4,0 \pm 4,5$  vs  $1,8 \pm 1,0$ ,  $p=0,09$ ). De la même manière, les caractéristiques des patients étaient similaires selon qu'il existait ou non une prolifération dirigée contre NS3, NS4, NS5 et C22 (résultats non présentés). Aucune corrélation significative n'était également constatée entre l'intensité de la prolifération lymphocytaire observée avec NS3, NS4, NS5, C22, le pool de protéines d'une part, et les caractéristiques épidémiologiques, biochimiques, virologiques et histologiques des malades d'autre part.

#### **4.2.5. Corrélations avec la réponse au traitement**

La présence d'une prolifération lymphocytaire significative ( $IS > 4$ ) observée avant traitement respectivement avec NS4, NS5, C22 et le pool de protéines n'était pas associée à la survenue d'une réponse thérapeutique immédiate (tableau 4). Une réponse proliférative dirigée contre NS3 était observée chez 40% des répondeurs et 0% des non répondeurs. Cette différence n'était cependant pas significative ( $p=0,09$ ). En revanche, en termes quantitatifs, les index de stimulation moyens observés avec les différentes protéines virales étaient plus élevés chez les malades répondeurs que chez les non répondeurs au traitement, de manière significative pour NS5 ( $19,8 \pm 23,2$  vs  $5,0 \pm 3,1$ ,  $p=0,03$ ) et le pool de protéines ( $32,8 \pm 45,0$  vs  $8,2 \pm 6,0$ ,  $p=0,05$ ) (tableau 5).

Après 3 mois de traitement, aucune évolution significative des index de stimulation n'était observée pour chacune des protéines virales, avec un index de stimulation observé avec le pool de protéines passant de  $25,5 \pm 40,3$  à  $24,2 \pm 50,8$ , ns. Aucune différence n'était observée entre les répondeurs ( $37,6 \pm 48,7$  vs  $36,6 \pm 62,4$ , ns) et les non répondeurs au traitement ( $5,5 \pm 1,7$  vs  $3,7 \pm 0,46$ , ns).

**Tableau 4: Pourcentage de malades ayant une lymphoprolifération significative (IS>4) en fonction de la réponse au traitement**

	Répondeurs (n=10)	Non répondeurs (n=8)	p
NS3	4 (40%)	0 (0%)	0,09
NS4	5 (50%)	5 (63%)	ns
NS5	6 (60%)	2 (25%)	ns
C22	5 (50%)	4 (50%)	ns
<b>Pool</b>	<b>8 (80%)</b>	<b>6 (75%)</b>	<b>ns</b>

**Tableau 5: Intensité de la lymphoprolifération chez les malades répondeurs et non répondeurs**

	Répondeurs (n=10)	Non répondeurs (n=8)	p
NS3	7,9±9,7	3,8±2,5	ns
NS4	16,2 ± 25,0	7,8 ± 4,8	ns
NS5	19,8 ± 23,2	5,0 ± 3,1	0,03
C22	9,9 ± 7,1	5,6 ± 3,1	ns
<b>Pool</b>	<b>32,8 ± 45,0</b>	<b>8,2 ± 6,0</b>	<b>0,05</b>

\*Résultats exprimés en index de stimulation moyens ± DS.

### 4.3. CYTOMÉTRIE DE FLUX

#### 4.3.1. Activation lymphocytaire

L'analyse en cytométrie de flux a été effectuée chez 16 malades, après stimulation en culture de 6 jours par le pool des différentes protéines virales. Cette stimulation permettait d'obtenir dans tous les cas un pourcentage significatif de lymphocytes activés (moyenne: 21%, extrêmes: 11% - 52%), identifiés en cytométrie par la présence de l'antigène membranaire CD25. Le pourcentage de lymphocytes activés (CD25+) était cependant plus faible en l'absence de prolifération significative détectable par incorporation de thymidine tritiée ( $16,0 \pm 4,9$  vs  $24,8 \pm 11,6$ ,  $p=0,07$ ). Il existait une corrélation à la limite de la significativité entre le pourcentage de cellules activées CD25+ et l'index de stimulation observé avec le pool de protéines ( $r=0,38$ ,  $p=0,08$ ).

#### 4.3.2. Phénotypage CD4/CD8

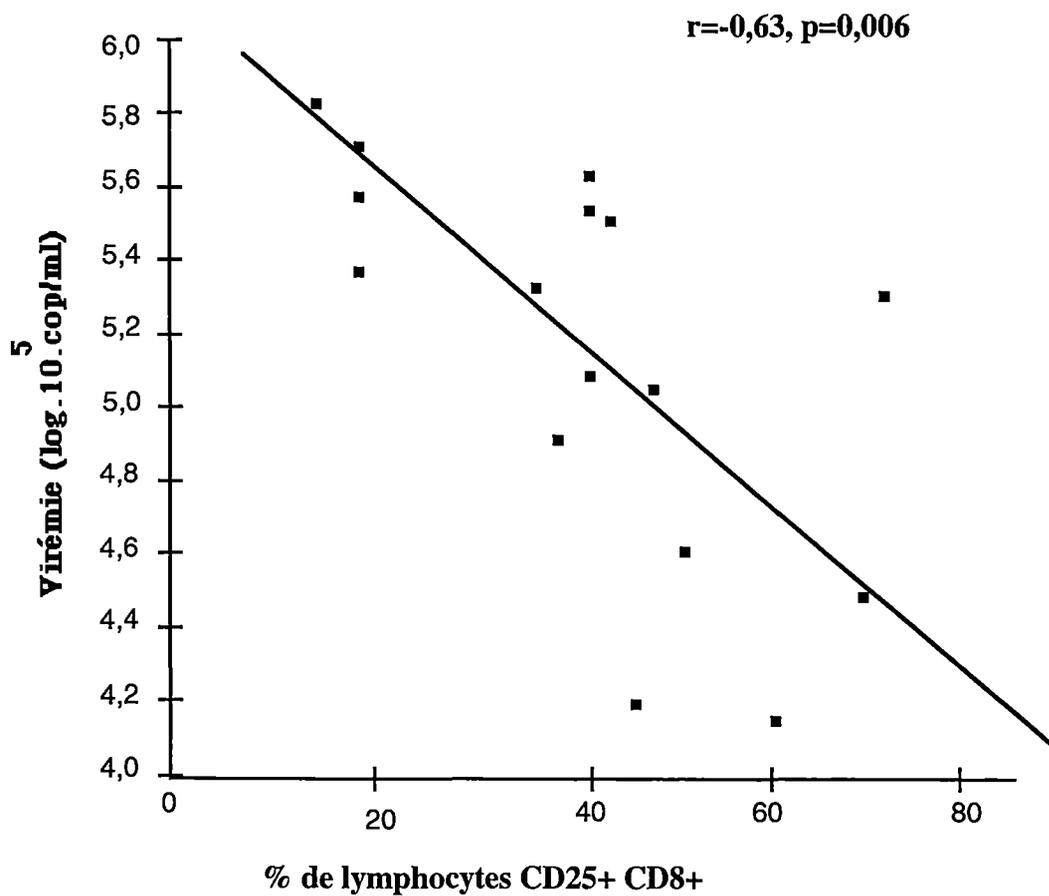
Les lymphocytes non activés (CD25-) étaient majoritairement de phénotype CD4 ( $59\% \pm 12\%$ , extrêmes : 41% -75%), et CD8 pour  $24\% \pm 10\%$  (extrêmes 12 à 52%) d'entre eux. Le rapport CD4/CD8 parmi ces lymphocytes non activés était en moyenne égal à  $2,8 \pm 1,3$ , et était supérieur à 1 chez 15 malades (94%). Ce rapport n'était pas corrélé à l'ensemble des caractéristiques des malades ni aux profils de prolifération lymphocytaires déterminés par incorporation de thymidine tritiée.

En revanche, parmi les lymphocytes activés (CD25+), le phénotype CD4 était en moyenne de  $40\% \pm 11\%$  (extrêmes: 21% - 58%), et le phénotype CD8 de  $42\% \pm 16\%$  (extrêmes: 16% - 75%). Le rapport CD4/CD8 était dans ce cas égal à  $1,2 \pm 0,9$ . Il existait cependant de grandes variations d'un patient à l'autre, puisque le rapport CD4/CD8 était supérieur à 1 chez 8 patients et inférieur à 1 chez les 8 autres patients.

De manière intéressante, le rapport CD4/CD8 parmi les lymphocytes activés identifiés par l'expression de CD25 était significativement corrélé à la virémie quantitative des patients ( $r=0,55$ ,  $p<0,01$ ). La virémie était effectivement plus faible chez les 8 patients ayant un rapport CD4/CD8 inférieur à 1 que chez les 8 patients ayant un rapport supérieur à 1 ( $1,5.10^5$  vs  $2,6.10^5$  cop/ml,  $p=0,05$ ). La virémie était en fait surtout corrélée négativement au pourcentage de lymphocytes activés CD8+ ( $r=-0,63$ ,  $p=0,006$ ), mais non au pourcentage de lymphocytes CD4+ (Figure 1). Il n'existait en revanche pas de corrélation entre le rapport CD4/CD8 et les autres caractéristiques des malades, en particulier avec l'activité sérique de l'ALAT ( $r=0,28$ ,  $p=0,15$ ) et avec l'activité histologique ( $r=0,35$ ,  $p=0,10$ ). Le tableau 6 résume les caractéristiques des patients en fonction de leur rapport CD4/CD8 parmi les cellules activées CD25+. Chez les patients ayant une activation lymphocytaire majoritairement CD8, il existait une tendance à la limite de la significativité en faveur d'une réponse proliférative et d'une expression de CD25 plus importante.

L'analyse en cytométrie de flux a par ailleurs montré qu'un certain nombre de lymphocytes n'exprimaient ni le marqueur CD4 ni le marqueur CD8. Le pourcentage de ces lymphocytes CD4-CD8- était en moyenne de  $19\% \pm 9\%$  (extrêmes: 11% - 39%) pour les cellules CD25- et de  $22\% \pm 10\%$  (extrêmes: 5%-41%) pour les cellules activées CD25+. Ce pourcentage n'était pas corrélé aux différentes caractéristiques cliniques, biochimiques, virologiques et histologiques des malades. Pour préciser le phénotype des cellules CD4-CD8-, un triple marquage complémentaire CD25/CD3/ $\gamma\delta$  a été réalisé chez 3 malades. Pour chacun de ces malades, les lymphocytes activés CD25+ étaient des lymphocytes T (CD3+) dans 85% des cas, exprimant un récepteur  $\gamma\delta$  dans 4% des cas. Ces résultats suggèrent que la population CD4-CD8- correspond majoritairement à des cellules non T (cellules NK, lymphocytes B) et minoritairement à des lymphocytes T  $\gamma\delta$ .

**Figure 1: Corrélation entre la virémie exprimée en Log(copies/ml) et le pourcentage de lymphocytes activés CD25 + de phénotype CD8 après 6 jours de stimulation par le pool de protéines virales.**



**Tableau 6: Caractéristiques des malades en fonction du phénotype CD4/CD8 des lymphocytes activés CD25+ après stimulation en culture par le pool de protéines virales.**

	Rapport CD4/CD8 <1	Rapport CD4/CD8 >1
	n=8	n=8
<b>Age (ans)</b>	46 ± 10,1	38,4 ± 4,7
<b>Sexe (% d'hommes)</b>	4 (50%)	5 (62,5%)
<b>Durée portage (ans)</b>	15,9 ± 4,2	22,2 ± 10,6
<b>Toxicomanie IV (n,%)</b>	3 (38%)	1 (13%)
<b>Transfusion (n,%)</b>	3 (38%)	6 (76%)
<b>ALAT (N)</b>	2,3 ± 1,8	3,3 ± 3
<b>Virémie (copies/ ml)</b>	1,5 ± 1,5£	2,6 ± 1,7£
<b>Génotype 1b</b>	2 (25%)	3 (38%)
<b>Quasi-espèces*</b>	9,2 ± 1,7	7,0 ± 2,6
<b>Index de stimulation</b>	24,4 ± 40,9	6,6 ± 6,6
<b>Expression de CD25 (%)</b>	24%	19%
<b>Score de Knodell</b>	6,0 ± 2,8	8,1 ± 1,7
<b>Activité METAVIR</b>	1,2 ± 0,4	1,7 ± 0,8
<b>Fibrose METAVIR</b>	2,0 ± 1,3	1,7 ± 1,0

Résultats exprimés en moyennes et en écart-types.

\*: Nombre de bandes en technique SSCP exprimé en médiane.

£: p=0,05

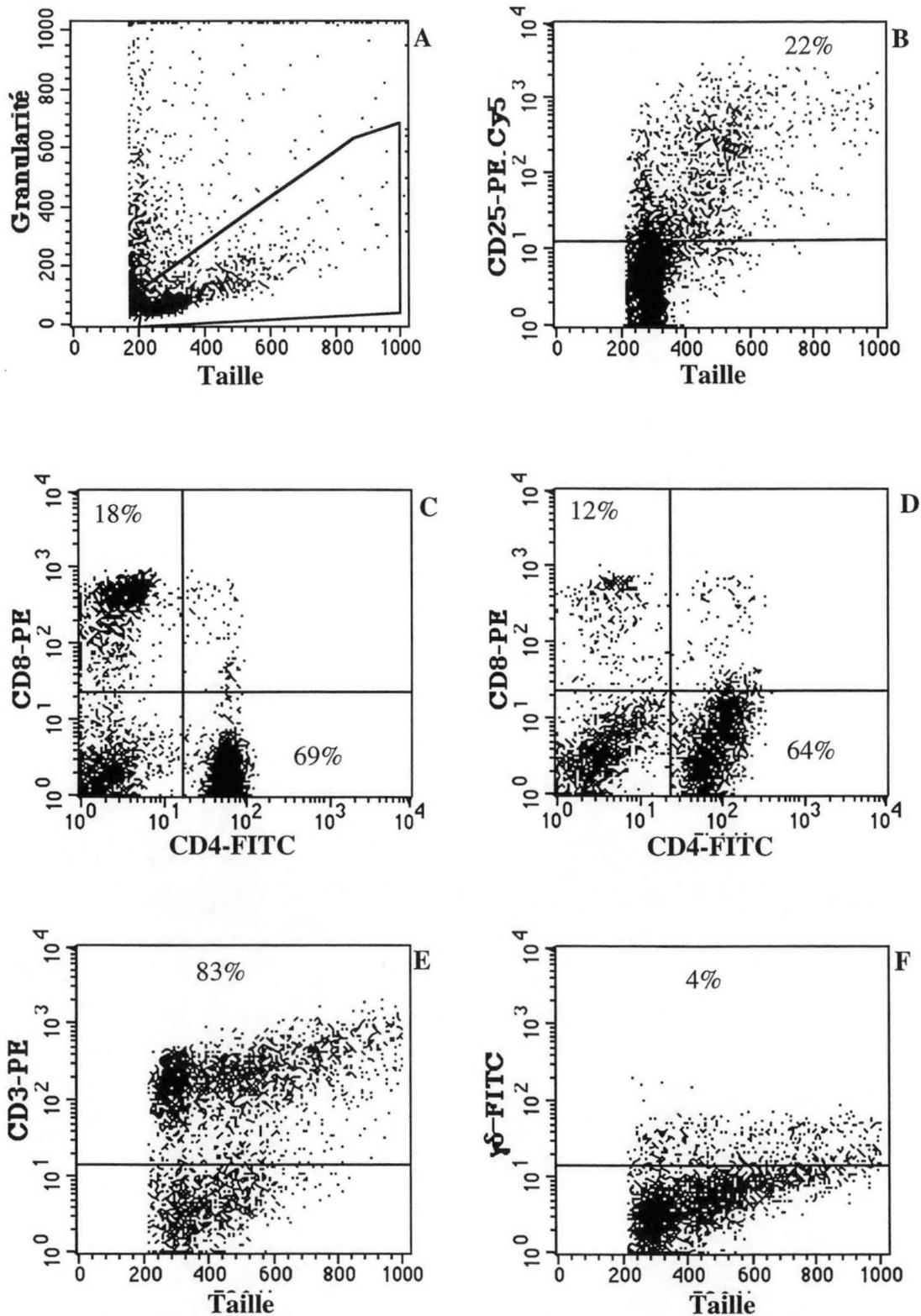
### 4.3.2. Corrélations avec la réponse au traitement

Le tableau 7 présente le pourcentage de cellules activées CD25+, et le phénotype CD4/CD8 des lymphocytes activés et non activés en fonction de la réponse au traitement. Il existait une tendance en faveur d'une activation lymphocytaire plus intense chez les patients répondeurs (24% vs 19%), mais cette différence n'était pas significative. Le phénotype CD4/CD8 des lymphocytes non activés en culture était similaire chez les patients répondeurs et non répondeurs. En revanche, le phénotype des lymphocytes activés CD25+ était majoritairement CD8 chez les répondeurs et majoritairement CD4 chez les non répondeurs, avec un rapport CD4/CD8 respectivement de  $0,7 \pm 0,3$  et de  $2,0 \pm 1,3$ ,  $p < 0,01$ . Ce rapport était inférieur à 1 chez 7/8 répondeurs et supérieur à 1 chez 6/7 non répondeurs ( $p < 0,01$ ). Les figures 2 et 3 représentent les résultats de cytométrie de flux en terme de pourcentage de lymphocytes CD25+ et de phénotype CD3, CD4, CD8 et  $\gamma\delta$ , obtenus respectivement chez un non répondeur (patient n°16) et un répondeur (patient n°8).

L'analyse en cytométrie de flux n'a pu être effectuée après 3 mois de traitement que chez 8 malades ( 3 répondeurs et 5 non répondeurs). Le pourcentage de lymphocytes activés CD25+ n'était pas modifié chez ces malades par rapport aux valeurs initiales ( $21 \pm 10$  vs  $20 \pm 7$ , ns), sans différence entre les répondeurs et les non répondeurs. De même, aucune modification du rapport CD4/CD8 moyen des lymphocytes activés ( $1,2 \pm 0,8$  vs  $1,5 \pm 1,0$ , ns) et non activés ( $2,8 \pm 1,3$  vs  $2,7 \pm 0,7$ , ns) n'était observé, encore une fois sans différence entre répondeurs et non répondeurs.

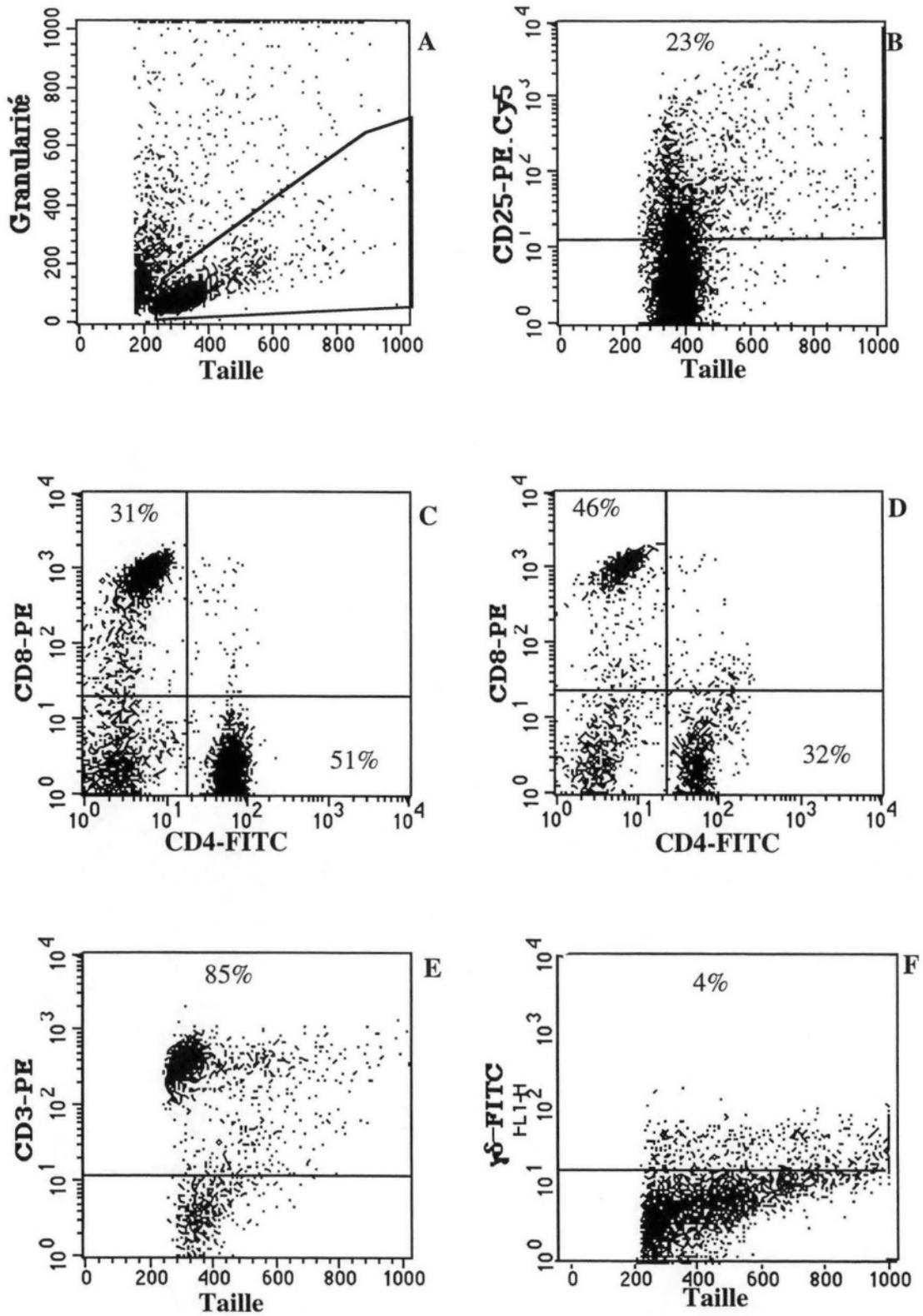
Le seul patient répondeur ayant initialement un rapport CD4/CD8 >1, avait toujours un rapport supérieur à 1 à 3 mois de traitement. Ce patient a présenté un échappement avec hypertransaminasémie et présence d'ARN du VHC par PCR à 6 mois de traitement. A l'opposé, le seul patient non répondeur ayant initialement un rapport CD4/CD8 <1 inversait son rapport après 3 mois de traitement (0,8 vs 1,4). Pour tous les autres patients, aucune inversion du rapport CD4/CD8 des cellules activées et non activées n'était observée après 3 mois de traitement.

Figure 2: Résultats de cytométrie de flux à M0 (patient non répondeur n°16)



A: Sélection morphologique des lymphocytes. B: Pourcentage de lymphocytes activés CD25+. C: Phénotype CD4/CD8 des lymphocytes CD25-. D: Phénotype CD4/CD8 des lymphocytes activés CD25+. E: Pourcentage de lymphocytes T (CD3+) parmi les lymphocytes CD25+. F: Pourcentage de lymphocytes T CD25+ ayant un récepteur  $\gamma\delta$ .

Figure 3: Résultats de cytométrie de flux à M0 (patient répondeur n°8)



**A:** Sélection morphologique des lymphocytes. **B:** Pourcentage de lymphocytes activés CD25+. **C:** Phénotype CD4/CD8 des lymphocytes CD25-. **D:** Phénotype CD4/CD8 des lymphocytes activés CD25+. **E:** Pourcentage de lymphocytes T (CD3+) parmi les lymphocytes CD25+. **F:** Pourcentage de lymphocytes T CD25+ ayant un récepteur  $\gamma\delta$ .

**Tableau 7: Pourcentage de lymphocytes activés (CD25+) et phénotype CD4/CD8 des lymphocytes activés et non activés (CD25-) en fonction de la réponse au traitement**

	Répondeurs (n=8)	Non répondeurs (n=7)	p
<b>% Cellules non activées CD25-</b>	76 ± 24	81 ± 18	ns
<b>% CD4 +</b>	55 ± 13	61 ± 8	ns
<b>% CD8 +</b>	26 ± 12	24 ± 5	ns
<b>Rapport CD4/CD8</b>	2,5 ± 1,2	2,7 ± 0,7	ns
<b>% Cellules activées CD25+</b>	24 ± 13	19 ± 4	0,10
<b>% CD4 +</b>	32 ± 9	46 ± 9	0,03
<b>% CD8 +</b>	50 ± 15	29 ± 12	0,03
<b>Rapport CD4/CD8</b>	0,7 ± 0,3	2,0 ± 1,3	0,01

Résultats exprimés en moyennes ± DS.

### **4.3. DOSAGE DES CYTOKINES**

Le dosage des cytokines par technique ELISA dans les surnageants de culture a été effectué après 72h de stimulation lymphocytaire par le pool de protéines virales chez les 20 patients avant traitement et chez les 18 patients ayant eu 3 mois de traitement. Une concentration supérieure au seuil de détection d'IL2 était observée dans tous les cas (moyenne:  $12,0 \pm 16,0$  pg/ml), d'IFN $\gamma$  dans 45% des cas (moyenne:  $1,4 \pm 2,3$  UI/ml), et d'IL10 dans 85% des cas (moyenne:  $399 \pm 499$  UI/ml) En revanche, la concentration dans les surnageants d'IL4 était inférieure au seuil de détection pour tous les malades.

#### **4.3.1. Corrélations avec les paramètres immunologiques**

La concentration d'IL2 dans les surnageants était significativement corrélée à l'index de stimulation obtenu par incorporation de thymidine tritiée avec le pool de protéines virales ( $r=0,38$ ,  $p=0,05$ ), et au pourcentage de cellules activées CD25+ identifiées en cytométrie de flux ( $r=0,39$ ,  $p=0,07$ ). Il existait une tendance non significative entre la concentration d'IL2 et le pourcentage de lymphocytes activés CD8+. Les concentrations d'IL10 et d'IFN $\gamma$  étaient corrélées entre elles ( $r=0,82$ ,  $p<0,0001$ ), mais n'étaient pas corrélées à la concentration d'IL2, à l'intensité de la prolifération lymphocytaire, au pourcentage de lymphocytes CD25+ et au rapport CD4/CD8 des lymphocytes activés et non activés Le tableau 8 représente les concentrations moyennes de cytokines respectivement en fonction de la présence d'une lymphoprolifération dirigée contre au moins une protéine, et du rapport CD4/CD8 des lymphocytes activés.

#### **4.3.2. Corrélations avec les caractéristiques de la maladie**

Les concentrations d'IL2 et d'IFN $\gamma$  n'étaient pas corrélées aux caractéristiques cliniques, biochimiques, virologiques et histologiques de la maladie. Seule la

concentration d'IL10 était corrélée négativement avec l'activité sérique de l'ALAT ( $r=-0,41$ ,  $p=0,04$ ), mais non avec la virémie et avec l'activité histologique.

#### **4.3.3. Corrélations avec la réponse au traitement**

Le tableau 9 représente les concentrations de cytokines obtenues avant et après 3 mois de traitement chez les malades répondeurs et non répondeurs au traitement. Il existait une tendance non significative en faveur d'une concentration initiale d'IL2 plus élevée chez les répondeurs ( $16,4 \pm 20,5$  vs  $7,6 \pm 5,0$ ,  $p=0,14$ ). En revanche, aucune évolution significative n'était observée après 3 mois de traitement quelque soit la réponse. Les niveaux initiaux d'IL10 et d'IFN $\gamma$  n'étaient pas associés à la réponse thérapeutique, et n'étaient pas modifiés après 3 mois de traitement.

#### **4.4. FACTEURS PREDICTIFS DE REPONSE AU TRAITEMENT**

Malgré le faible nombre de malades inclus dans l'étude, une étude multivariée incluant les paramètres immunologiques a été effectuée pour tenter d'identifier les facteurs indépendants prédictifs de la réponse immédiate au traitement. Les variables suivantes, ayant une valeur  $p < 0,15$  en analyse univariée, ont été incluses dans le modèle de régression logistique: la durée du portage, le génotype viral, la virémie quantitative, l'intensité de la réponse proliférative en thymidine tritiée obtenue avec le pool de protéines, le pourcentage de lymphocytes activés CD25+, la concentration d'IL2 dans le milieu de culture, et le rapport CD4/CD8 observé parmi les lymphocytes activés. En analyse multivariée, les 2 facteurs indépendants prédictifs de la réponse au traitement étaient la présence d'un rapport CD4/CD8  $< 1$  (RR=8,2; IC95%:2,1-60,5,  $p < 0,05$ ), et l'infection par un génotype viral non 1b (RR=4,8; IC95%: 1,2-54,5;  $p=0,08$ ).

**Tableau 8: Concentration d'IL2, d'IL4, d'IL10 et d'IFN $\gamma$  en fonction de la présence ou non d'une prolifération lymphocytaire et du rapport CD4/CD8 parmi les lymphocytes activés CD25+.**

	Prolifération lymphocytaire		Rapport CD4/CD8 (CD25+)	
	Présence (n=13)	Absence (n=7)	< 1 (n=8)	> 1 (n=8)
<b>IL2 (pg/ml)</b>	17,7 $\pm$ 18,4£	6,0 $\pm$ 2,4£	17,4 $\pm$ 23,2	8,1 $\pm$ 4,9
<b>IL10 (UI/ml)</b>	215,6 $\pm$ 302,0	741,3 $\pm$ 629,4	414,1 $\pm$ 371,3	655,7 $\pm$ 654,9
<b>IFN<math>\gamma</math> (UI/ml)</b>	1,0 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 3,2	1,1 $\pm$ 1,3	2,6 $\pm$ 3,2
<b>IL4 (UI/ml)</b>	-	-	-	-

Résultats exprimés en moyennes  $\pm$  DS

£: p<0,05

**Tableau 9: Concentration d'IL2, d'IL4, d'IL10 et d'IFN $\gamma$  avant (M0J1) et après 3 mois (M4J1) de traitement chez les malades répondeurs et non répondeurs.**

	Répondeurs (n=10)	Non répondeurs (n=8)	p
<b>IL2 (pg/ml)</b>			
M0J1	16,4 $\pm$ 20,5	7,6 $\pm$ 5,0	0,14
M4J1	12,3 $\pm$ 21,6	11,2 $\pm$ 8,7	ns
<b>IL10 (UI/ml)</b>			
M0J1	202 $\pm$ 291	428 $\pm$ 643	ns
M4J1	189 $\pm$ 237	391 $\pm$ 328	ns
<b>IFN<math>\gamma</math> (UI/ml)</b>			
M0J1	0,8 $\pm$ 1,3	1,9 $\pm$ 2,9	ns
M4J1	0,4 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 3,6	ns
<b>IL4 (UI/ml)</b>			
M0J1	-	-	-
M4J1	-	-	-

Résultats exprimés en moyennes  $\pm$  DS

# **DISCUSSION**

## **5. DISCUSSION**

Nous avons dans ce travail prospectif ayant inclu 20 malades atteints d'hépatite chronique C, étudié la réponse des lymphocytes T du sang périphérique au cours d'une stimulation en culture par des protéines virales recombinantes. Bien que le site de l'infection virale C soit essentiellement hépatique, notre choix d'étudier des lymphocytes périphériques, techniquement plus accessibles, était justifié par la propriété de recirculation de ces cellules. La recherche de lymphocytes T spécifiques stimulés par des antigènes viraux C a fait intervenir trois types de tests immunologiques: la recherche d'une prolifération lymphocytaire T en culture par incorporation de thymidine tritiée, la détection de signaux membranaires d'activation lymphocytaire en cytométrie de flux, et enfin la quantification dans le milieu de culture de cytokines comprenant l'IL2, principale cytokine mitogénique pour les lymphocytes T. Les résultats convergents de ces trois tests ont confirmé la présence dans le sang de lymphocytes stimulables par les différentes protéines virales et capables de sécréter des cytokines, suggérant qu'il s'agit de lymphocytes T spécifiques du VHC. Nos résultats suggèrent que les caractéristiques de cette réponse lymphocytaire pourraient être liées à deux paramètres importants à la phase chronique de la maladie: le niveau de virémie et le degré de réponse au traitement.

### **5.1.RECHERCHE DE LYMPHOCYTES PÉRIPHÉRIQUES SPÉCIFIQUES DU VHC**

#### **5.1.1. Détection d'une prolifération lymphocytaire**

La première partie de notre travail a consisté à évaluer la réponse proliférative des lymphocytes T périphériques de malades atteints d'hépatite chronique C vis-à-vis de différentes protéines virales recombinantes.

### *5.1.1.1. Aspects méthodologiques*

Parmi les 20 malades atteints d'hépatite chronique C analysés, une réponse proliférative significative des lymphocytes du sang périphérique dirigée contre au moins une des protéines virales étudiées (capside, NS3, NS4, NS5) était observé dans 65% des cas. Ce résultat était globalement similaire à ceux rapportés dans la littérature. En effet, parmi les 8 études identifiées ayant également évalué la réponse lympho-proliférative périphérique au cours de l'hépatite chronique C, portant sur un total 258 malades, le pourcentage moyen de réponse proliférative dirigée contre au moins une protéine virale était de 64% (extrêmes: 55%-90%) (Botarelli et al<sup>7</sup>; Schupper et al<sup>79</sup>; Ferrari et al<sup>25</sup>; Hoffman et al<sup>35</sup>; Yang et al<sup>98</sup>; Leroux-Roels et al<sup>50</sup>; Lechman et al<sup>49</sup>; Bronowicki et al<sup>9</sup>) Le tableau 10 présente les principales caractéristiques méthodologiques et les résultats de ces études.

Les deux protéines les plus immunogènes étaient dans notre travail NS4 et C22, entraînant chacune une réponse proliférative chez 50% des malades. Les pourcentages cumulés de réponse proliférative, calculés à partir des résultats des 8 essais identifiés, étaient de 38% pour NS3, 28% pour NS4 et C22, et 14% pour NS5. Une importante hétérogénéité des résultats était toutefois observée entre les différentes études. La protéine de capside était la plus immunogène dans les études de Hoffman et al<sup>35</sup>, Ferrari et al<sup>25</sup> et Lechman et al<sup>49</sup>, alors qu'il s'agissait de NS4 pour Botarelli et al<sup>7</sup> et de NS3 pour Bronowicki et al<sup>9</sup>. Les pourcentages de réponse lymphoproliférative variaient de 21% à 66% pour NS3, de 10% à 87% pour NS4, de 3% à 26% pour NS5, et de 10% à 44% pour C22.

L'hétérogénéité des résultats observés pourrait être liée à plusieurs facteurs. Le premier concerne la sélection des malades dont les caractéristiques étaient différentes selon les études. En particulier, le nombre de malades virémiques, qui était de 100% dans notre étude comme dans celles de Ferrari et al<sup>25</sup> et de Leroux-Roels et al<sup>50</sup>, n'était que de 60% dans l'étude de Lechman et al<sup>49</sup>, et n'était pas précisé dans les études de Botarelli et al<sup>7</sup> et de Schupper et al<sup>79</sup>. De même, le génotype et la gravité histologiques,

Tableau 10: Études de prolifération des lymphocytes périphériques stimulés par des protéines virales recombinantes.

Auteur	Année	Malades (n)	Cellules / puits (10 <sup>5</sup> )	Protéines / puits (µg/ml)	Durée culture (jours)	Méthode mesure	Résultats (% de malades ayant une prolifération significative)				
							NS3	NS4	NS5	C22	Total*
Botarelli	93	41	2	9	6	T tritiée	-	34%	3%	10%	59%
Bronowicki	97	20	3	10	6	T tritiée	50%	10%	20%	25%	55%
Ferrari	94	29	0,5	10	7	T tritiée	-	19%	3%	41%	74%
Hoffman	95	43	0,5	1	5	T tritiée	21%	19%	21%	44%	56%
Lechman	96	29	0,6	1	6	T tritiée	22%	19%	26%	30%	63%
Leroux Roels	96	35	4	10	5	T tritiée	23%	-	-	-	-
Schupper	93	20	10	1	5	CMF	64%	87%	-	90%	90%
Yang	95	41	3	8	7	T tritiée	66%	-	-	-	-

\*: Pourcentage de malades ayant une prolifération avec au moins une protéine virale.

en particulier le pourcentage de cirrhose, n'étaient pas systématiquement précisés. Le deuxième point concerne les différences dans la méthodologie employée. Les protéines virales utilisées dans la majorité des études, dérivées du génotype 1a et fournies par Chiron Corporation, étaient similaires à celles employées dans notre travail. Dans l'étude de Yang et al<sup>98</sup>, la protéine recombinante de NS3, exprimée dans E coli et dérivée du génotype 1b, recouvrait la séquence d'acides aminés 1188-1493, alors qu'il s'agissait dans la protéine fournie par Chiron Corporation de la séquence 1188-1463, et de la séquence 1007-1534 dans la protéine NS3 fournie par Mikrogen et utilisée par Lechman et al<sup>49</sup> et Hoffman et al<sup>35</sup>. Les conditions de culture étaient également largement différentes d'une étude à l'autre. Si la plupart des auteurs utilisaient des plaques de culture à 96 puits, les concentrations cellulaires par puits variaient entre  $6.10^4$  (Lechman et al<sup>49</sup>) et  $4.10^5$ . (Leroux Roels et al<sup>50</sup>). Dans des manipulations préliminaires ayant comparé  $10^5$  et  $2.10^5$  cellules par puits, nous avons observé des index de stimulation supérieurs avec la première concentration, ce qui a justifié notre choix. Dans l'étude de Schupper et al<sup>79</sup>, qui retrouvait une prolifération significative dans 90% des cas, la culture était réalisée dans des plaques de 24 puits contenant  $10^6$  cellules par puits. Dans cette étude, l'intensité de la prolifération était mesurée par une détection du nombre de cellules en phase S en cytométrie de flux, alors que la technique d'incorporation de thymidine tritiée était utilisée dans toutes les autres études, dont la nôtre. De la même façon, les concentrations de protéines virales variaient entre les études entre 1 et  $10\mu\text{g/ml}$ . La seule étude ayant comparé les concentrations de 1 et  $10\mu\text{g/ml}$  concluait à une efficacité supérieure de la concentration la plus élevée en terme d'intensité de prolifération (Ferrari et al<sup>25</sup>). Lors de manipulations préliminaires ayant comparé les concentrations de 1 et  $10\mu\text{g/ml}$ , nous avons également observé une réponse proliférative plus fréquente et plus intense avec la concentration de  $10\mu\text{g/ml}$ . Ce résultat n'a cependant pas été observé avec C22, qui inhibait de 50% à cette concentration la prolifération lymphocytaire obtenue avec une stimulation mitogénique par le pokeweed mitogen . Cet effet inhibiteur, également rapporté par Botarelli et al<sup>7</sup>, nous a conduit à utiliser la concentration de  $1\mu\text{g/ml}$ , dépourvue d'effet inhibiteur, pour cette protéine. Le

troisième facteur pouvant expliquer les discordances observées entre les différentes études pourrait également être d'ordre statistique. En effet, le nombre de patients étudiés étaient dans toutes les études faibles, variant entre 20 et 43, de tels effectifs favorisant d'importantes fluctuations d'échantillonnage.

#### *5.1.1.2. Corrélations avec la réponse humorale*

Quelque soit la méthodologie utilisée dans les différentes études publiées, aucune lymphoprolifération significative n'était observée chez un nombre non négligeable de patients. Ce pourcentage, de 35% dans notre travail, reste surprenant, compte-tenu de la présence simultanée dans la majorité des cas d'anticorps dirigés contre les mêmes antigènes, détectés en RIBA. En effet, la synthèse d'anticorps nécessite l'activation préalable de lymphocytes T CD4+ spécifiques dont la présence aurait pu être détectée en culture. Parmi les facteurs pouvant expliquer cette absence de détection, la variabilité du VHC pourrait jouer un rôle important. En effet, certains antigènes viraux recombinants pourraient ne pas être reconnus par les lymphocytes T dirigés contre des épitopes d'isolats viraux différents. Cependant, il n'existait pas dans notre travail de différence de prolifération entre les différents génotypes viraux, alors que les protéines recombinantes utilisées étaient de génotype 1a. Le deuxième facteur pouvant expliquer cette absence de prolifération lymphocytaire T en présence d'anticorps pourrait être lié à la localisation périphérique des lymphocytes étudiés. En effet, certains auteurs ont suggéré une compartimentalisation des lymphocytes spécifiques du VHC au niveau intra-hépatique. Une étude menée au laboratoire d'immunochimie (U238) de Grenoble portant sur l'analyse moléculaire du TCR (analyse des fragments CDR3) a montré que la diversité des lymphocytes intra-hépatiques était restreinte par rapport au sang périphérique, suggérant que la population lymphocytaire T intra-hépatique était différente de celle du sang périphérique (Jouvin-Marche et al<sup>41</sup>). Minutello et al<sup>57</sup> ont d'ailleurs obtenu des clones de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du VHC dirigés contre des épitopes différents dans le foie et

en périphérie. Le dernier point concerne la sensibilité de la technique utilisée pour détecter une prolifération lymphocytaire. Le choix d'un seuil d'index de stimulation supérieur à 4 pour parler de positivité offre une spécificité satisfaisante, comme en témoignent nos résultats chez les donneurs de sang séro-négatifs. En revanche, ce seuil pourrait méconnaître des niveaux de prolifération faibles mais néanmoins spécifiques de l'antigène utilisé. Dans l'étude de Hoffman et al<sup>35</sup> utilisant un index de stimulation à 3, les pourcentages de prolifération n'étaient cependant pas supérieurs aux autres études. Le manque de sensibilité de la technique de mesure de la prolifération est toutefois conforté par la présence d'une activation lymphocytaire déterminée en cytométrie de flux et observée même en l'absence de prolifération significative.

#### *5.1.1.3. Corrélations avec les caractéristiques de la maladie*

Aucune corrélation significative n'était observée dans notre travail entre le profil de lymphoprolifération vis à vis des différentes protéines virales et les caractéristiques cliniques, biologiques ou histologiques des malades. Il existait cependant une tendance en faveur d'une activité sérique de l'ALAT plus importante en cas de réponse proliférative. Ce résultat pourrait suggérer que la réponse lymphocytaire T joue un rôle dans la nécrose hépatocytaire. Toutefois, il n'existait pas de corrélation avec l'intensité des lésions histologiques nécrotico-inflammatoires, qui restent cependant soumises aux variations d'échantillonnage et au manque de reproductibilité des scores histologiques. L'étude de Botarelli et al, effectuée chez 41 malades, ne retrouvait aucune corrélation entre la présence d'une prolifération lymphocytaire et les caractéristiques de la maladie. En revanche, les trois études ayant comparé des malades atteints d'hépatite chronique à des patients ayant une sérologie anti-VHC positive, mais des transaminases normales et une PCR négative ont chacune conclu à une prolifération plus fréquente et plus intense dans ce groupe, en particulier dirigée contre la protéine de capsid (Ferrari et al<sup>25</sup>; Botarelli et al<sup>7</sup>; Lechman et al<sup>49</sup>). Ces résultats suggèrent donc une réponse lymphocytaire T plus puissante chez les patients ayant spontanément éradiqué le virus,

population non étudiée dans notre travail. Ces résultats sont confirmés par ceux de Diepolder et al<sup>18</sup>, suggérant qu'à la phase aiguë de l'infection, la présence d'une prolifération lymphocytaire T dirigée contre un pool de peptides dérivés de NS3 serait prédictive d'une évolution vers la guérison de l'hépatite.

#### ***5.1.1.4. Corrélations avec la réponse au traitement***

Peu d'études ont évalué l'importance de la réponse lymphoproliférative périphérique anti-VHC comme facteur prédictif et explicatif de réponse au traitement par IFN $\alpha$ . Malgré le nombre limité de malades inclus, nous avons montré qu'une réponse lymphocytaire proliférative plus intense était observée chez les malades répondeurs au traitement, en particulier dirigée contre NS3. En revanche, compte-tenu de la date de début de l'étude, nous n'avons pas pu comparer les patients répondeurs soutenus aux patients rechuteurs. Hoffman et al<sup>35</sup> ont suggéré chez 16 malades traités qu'une réponse proliférative dirigée contre la protéine de capsid était plus fréquente chez les répondeurs soutenus que chez les rechuteurs et les non répondeurs. De même, Botarelli et al<sup>7</sup> ont rapporté des pourcentages élevés de prolifération contre la capsid chez des répondeurs soutenus étudiés un an après la fin du traitement. Ces pourcentages étaient équivalents à ceux observés chez les patients ayant spontanément éradiqué le virus, et significativement supérieurs à ceux observés chez les malades non traités.

Nous avons également évalué l'évolution sous IFN $\alpha$  de la réponse lymphoproliférative, en particulier en fonction de la réponse au traitement. Après 3 mois de traitement, aucune évolution qualitative ou quantitative n'était observée quelque soit la réponse au traitement. Ces résultats sont confortés par l'étude de Grellier et al<sup>32</sup>, portant sur 12 malades traités par IFN $\alpha$ . Dans cette étude, il existait une diminution non significative de l'intensité de la prolifération lymphocytaire pendant la durée du traitement quelque soit la réponse immédiate. En revanche, il existait une augmentation significative des index de stimulation apparaissant 3 mois après la fin du traitement et limitée aux seuls malades répondeurs soutenus. Missale et al<sup>58</sup> ont

également rapporté qu'il existait après traitement une majoration de la réponse proliférative vis à vis de la capsidite plus intense chez les patients répondeurs. Dans cette étude, cette majoration était dépendant du génotype, puisqu'elle était plus fréquente avec le génotype 2c qu'avec le génotype 1b. Nous n'avons en revanche pas trouvé dans notre travail de relation avec le génotype viral, mais aucun malade n'était infecté par un génotype 2c.

### **5.1.2. Détection d'une activation lymphocytaire**

La deuxième approche utilisée pour déterminer la présence de lymphocytes périphériques spécifiques du VHC a été l'identification en cytométrie de flux de marqueurs membranaires d'activation sur les lymphocytes stimulés par les protéines virales recombinantes.

Le choix d'un marqueur d'activation s'est porté sur l'expression membranaire de la chaîne alpha du récepteur de l'IL2, appelé CD25, détectable par un anticorps marqué anti-CD25 dont le site de fixation était indépendant de celui de l'IL2. Au cours de manipulations préliminaires sur des systèmes de culture utilisant une stimulation par l'antigène HBs de lymphocytes de sujets vaccinés contre l'hépatite B, nous avons montré que l'expression de CD25 apparaissait après 72h, pour atteindre un pic après 6 jours de culture (résultats non publiés). Cette expression était corrélée dans ce système à l'index de stimulation observé par incorporation de thymidine tritiée, à l'expression de HLA-DR, autre marqueur d'activation, mais non à la taille des lymphocytes, critère d'activation pourtant habituellement utilisé dans la littérature (Yang et al<sup>98</sup>; Botarelli et al<sup>7</sup>).

Outre le choix du marqueur d'activation CD25, l'originalité de notre travail a consisté à stimuler les lymphocytes à l'aide d'un pool des différentes protéines virales disponibles, après avoir vérifié l'absence d'inhibition réciproque de ces protéines en culture. Ce choix n'a pas été effectué dans l'optique de "mimer" le virus, mais a permis de présenter à un nombre limité de cellules un grand nombre d'épitopes viraux

potentiels. Ce système a permis d'obtenir pour l'ensemble des malades un pourcentage significatif de lymphocytes activés, compris entre 11 et 52%, cela même en l'absence de prolifération lymphocytaire détectable par incorporation de thymidine tritiée. Le pourcentage de lymphocytes activés étaient cependant dans ce cas plus faibles, avec une corrélation à la limite de la significativité entre l'index de stimulation observé avec le pool de protéines et l'expression de CD25. L'utilisation d'un pool de protéines tel que nous l'avons réalisé n'a cependant pas permis de préciser si la spécificité de ces lymphocytes était limitée à certains antigènes ou si elle intéressait l'ensemble des protéines virales. De plus, l'absence d'expression de CD25 dans les mêmes conditions de stimulation chez des donneurs de sang VHC négatifs n'a pas été vérifiée compte-tenu des quantités très restreintes de protéines virales recombinantes disponibles.

Ces résultats, d'ailleurs corrélés aux concentrations dans le milieu de culture d'IL2, principale cytokine mitogénique, suggèrent la présence en quantité variable de lymphocytes T périphériques spécifiques du VHC chez tous les malades; l'identification en cytométrie de flux de l'expression de CD25 étant plus sensible que la détection d'une prolifération lymphocytaire par incorporation de thymidine tritiée. Quelque soit la technique utilisée, il n'a pas été possible dans un contexte de faible puissance statistique liée à l'effectif de malades d'établir de corrélations entre l'intensité de la réponse lymphocytaire globale et les caractéristiques de la maladie. Une réponse lymphocytaire intense pourrait en revanche être associée à une meilleure efficacité du traitement, peut-être par l'intermédiaire de l'activation de certaines populations lymphocytaires.

## **5.2. IDENTIFICATION DU PHÉNOTYPE DES CELLULES ACTIVÉES**

### **5.2.1. Interprétation des résultats**

La cytométrie de flux offre la possibilité d'effectuer des marquages membranaires multiples. Nous avons donc déterminé à l'aide d'un triple marquage

CD4-FITC/CD8-PE/CD25-PE-Cy5 le phénotype des lymphocytes activés. Nos résultats ont montré qu'un pourcentage non négligeable de lymphocytes activés, variant entre 16% et 75% selon les malades, étaient de phénotype CD8, et donc potentiellement cytotoxiques. Ce résultat est surprenant puisque les antigènes exogènes, comme c'est le cas des protéines virales en culture, sont habituellement présentés par les molécules HLA de classe II et aboutissent classiquement à l'activation et à la prolifération de lymphocytes CD4+. Plusieurs études récentes ont cependant suggéré que les antigènes exogènes pouvaient également être présentés par les molécules HLA de classe I et aboutir à une réponse T cytotoxique (Wijburg et al<sup>94</sup>, Bohm et al<sup>6</sup>). Toutefois, dans les différentes études ayant déterminé le phénotype des lymphocytes après 6 jours d'activation par des protéines virales C, le phénotype était majoritairement CD4+, observé dans 70 à 80% des cas (Botarelli et al<sup>7</sup>; Yang et al<sup>98</sup>). Les critères d'activation lymphocytaire étaient dans ce cas des critères morphologiques accessibles en cytométrie, notamment la taille (les lymphocytes subissant une transformation blastique augmentant de taille). Nous avons cependant montré les limites de ce critère, puisque dans notre travail, seuls 20% des lymphocytes CD25+ étaient de grande taille, cette population n'étant donc pas représentative de l'ensemble des lymphocytes activés. Botarelli et al<sup>7</sup> et Hoffman et al<sup>35</sup> ont également montré que la prolifération lymphocytaire était bloquée par des anticorps bloquants anti-HLA de classe II mais non par les anticorps anti-HLA de classe I. Dans ces conditions, la détection de lymphocytes CD8 activés dans notre travail reste surprenante. L'explication pourrait être la présence d'une réponse initiale exclusivement CD4+, indispensable, et suivie d'une activation CD8 d'intensité variable selon les malades. Cette hypothèse devra cependant être vérifiée en effectuant une cinétique en fonction du temps de culture du rapport CD4/CD8 des lymphocytes activés.

L'interprétation du pourcentage de lymphocytes activés de phénotype CD8 obtenus reste difficile puisque la quantification a lieu après 6 jours de culture in vitro, et non à partir du sang directement prélevé des malades, situation où le nombre de lymphocytes spécifiques d'un antigène donné est très faible, de l'ordre de 1 sur 10<sup>6</sup>. De

plus, une quantification des populations lymphocytaires CD4/CD8 n'a pas été effectuée dans notre étude. Le rapport CD4/CD8 n'est cependant habituellement pas modifié au cours de l'hépatite chronique C. De plus, parmi les lymphocytes T non activés après 6 jours de culture, le rapport CD4/CD8 était systématiquement supérieur à 1, indépendamment du rapport observé pour les lymphocytes activés. Ceci suggère que la quantification des lymphocytes CD8, même biaisée par une durée de culture de 6 jours, pourrait être le reflet du nombre de lymphocytes circulants CD8 spécifiques du VHC.

### 5.2.2. Corrélation avec les caractéristiques de la maladie

Le résultat le plus important de notre travail concerne la corrélation établie entre le nombre de lymphocytes T activés CD8+ obtenus à partir du sang périphérique et la virémie des malades. Cette corrélation suggère que ces lymphocytes CD8+ pourraient être des lymphocytes cytotoxiques. Certains de ces lymphocytes pourraient également être des cellules NK, mais nous avons montré que 85% des cellules étaient de phénotype CD3, et la fluorescence CD8, élevée, était de type lymphocyte T et non NK. Les marqueurs spécifiques des cellules NK n'ont cependant pas pu être étudiés en raison du nombre limité de cellules et de protéines disponibles.

Plusieurs auteurs ont effectué des tests de cytotoxicité à partir de lymphocytes issus du sang périphérique de malades HLA-A2 (Koziel et al<sup>45</sup>, Cerny et al<sup>14</sup>). Des lymphocytes cytotoxiques, de phénotype CD8 et d'activité restreinte par les molécules de classe I du CMH, dirigés contre de multiples épitopes en particulier de la capsid, ont été obtenus après stimulation in vitro par des antigènes recombinants. Une étude récente menée chez 27 malades HLA B44, a montré que la présence d'une activité cytotoxique périphérique dirigée contre un épitope de la capsid, observée dans 25% des cas, était significativement associée à une faible virémie (Hiroishi et al<sup>34</sup>). Des clones de lymphocytes T CD8 cytotoxiques dérivés du foie ont été obtenus (Minutello et al<sup>57</sup>). Nelson et al<sup>64</sup> ont également montré que la présence au niveau intra-hépatique de lymphocytes T CD8 spécifiques de la capsid ayant une activité cytotoxique était

corrélée à un faible niveau de virémie et à des lésions nécrotico-inflammatoires hépatiques plus intenses.

Dans notre travail, il n'existait pas d'association entre le nombre de lymphocytes activés CD8+ d'une part et les lésions nécrotico-inflammatoires hépatiques et l'activité de l'ALAT d'autre part. Malgré le faible nombre de malades étudiés, l'absence d'une telle association également retrouvée par Hiroishi et al conforte ce résultat. Il est également admis qu'il n'existe pas de corrélation entre la virémie, qui pourrait donc être limitée par la réponse lymphocytaire T cytotoxique, l'intensité des lésions nécrotico-inflammatoires histologiques, et l'activité sérique de l'ALAT (Lau et al<sup>47</sup>). Ceci pose une nouvelle fois le problème non résolu de l'origine des lésions hépatocytaires, qui pourraient être liées à la fois à un effet cytopathique du virus et à la réponse immunitaire de l'hôte.

Une des limites de notre travail a été l'absence d'évaluation de la spécificité des lymphocytes T CD8 activés que nous avons obtenu. Ces cellules pourraient être triées soit par cytométrie, soit par utilisation de billes magnétiques, remises en culture en présence de cellules exprimant les antigènes viraux C afin d'évaluer leur potentiel cytotoxique. Une étude du répertoire du récepteur V $\beta$  de ces cellules pourrait également être effectuée et comparée au répertoire des lymphocytes T intra-hépatiques. Récemment, une technique d'identification des lymphocytes T cytotoxiques à l'aide de tétramères de molécules HLA a été décrite (Schwartz<sup>80</sup>). Le principe de cette technique est l'utilisation de complexes tétramériques assurant une bonne stabilité moléculaire, chaque unité comprenant la chaîne alpha du CMH de classe I, la  $\beta$ 2-microglobuline, et un peptide antigénique, et chaque complexe étant marqué par un fluorochrome, rendant possible sa détection en cytométrie de flux. Les limites de cette technique sont d'une part la nécessité de connaître les épitopes viraux immunogènes, et d'autre part d'utiliser la même protéine HLA que celle du malade testé. L'utilisation de cette technique a récemment permis d'établir une corrélation négative entre la présence de lymphocytes T CD8 et la charge virale au cours de l'infection par le VIH (Ogg et al<sup>67</sup>). Cette méthode

pourrait être particulièrement intéressante pour évaluer la spécificité des lymphocytes CD8 que nous avons obtenus.

### 5.2.3. Corrélation avec la réponse au traitement

Le deuxième point capital de notre étude concerne l'association entre la présence d'une activation lymphocytaire CD8 et la réponse immédiate au traitement, le paramètre le plus discriminant étant le rapport CD4/CD8 parmi les lymphocytes activés. Ce résultat n'a à notre connaissance jamais été rapporté à partir de l'étude de lymphocytes périphériques. Nelson et al<sup>65</sup> ont récemment montré chez 19 malades HLA-A2 traités par IFN $\alpha$  qu'une activité cytotoxique obtenue à partir de lymphocytes intra-hépatiques était observée chez 78% des répondeurs au traitement et chez seulement 10% des non répondeurs ( $p < 0,01$ ). Ces résultats concordants suggèrent donc l'importance de la réponse immunitaire de l'hôte comme facteur prédictif de réponse au traitement. Les principaux facteurs prédictifs de réponse actuellement identifiés sont le génotype viral et le niveau de la virémie (Martinot-Peignoux et al<sup>56</sup>). Malgré le faible nombre de malades de notre étude, nous avons mené une analyse multivariée qui suggère que les seuls facteurs indépendants prédictifs de la réponse au traitement sont la réponse lymphocytaire CD8 de l'hôte et le génotype. L'analyse multivariée réalisée dans l'étude de Nelson et al<sup>65</sup> chez 19 malades traités montre un résultat similaire au niveau intra-hépatique. Ces résultats, qui doivent être confirmés par d'autres études prospectives incluant un grand nombre de malades, suggèrent que la réponse lymphocytaire CD8 de l'hôte est capable à la fois de maintenir un niveau de virémie faible et de favoriser la réponse au traitement par IFN $\alpha$ . Les épitopes viraux déterminants restent cependant à déterminer. En revanche, nous n'avons pas pu comparer les malades rechuteurs à ceux ayant une réponse soutenue, la majorité des malades n'ayant actuellement pas terminé leur traitement.

Le mécanisme par lequel le niveau de lymphocytes T périphériques de phénotype CD8 contribue à améliorer l'efficacité de l'IFN $\alpha$  pourrait être expliqué par

ses propriétés immunomodulatrices. En effet, l'IFN $\alpha$  active la cytotoxicité anti-virale des lymphocytes cytotoxiques et augmente l'expression des molécules de classe I du CMH sur la membrane des hépatocytes infectés. Seuls les malades possédant un niveau initial suffisant de lymphocytes cytotoxiques pourraient donc bénéficier de cette propriété. Dans notre travail, nous n'avons pas observé d'augmentation du pourcentage de lymphocytes T activés CD8+ après 3 mois de traitement quelque soit la réponse thérapeutique. Cependant, seuls 8 malades ont été étudiés, et encore une fois, nous n'avons pas effectué de tests de cytotoxicité. La possibilité d'une synergie d'action avec les propriétés directement antivirales de l'IFN $\alpha$  ne peut également être exclue si l'on admet que la présence de lymphocytes T cytotoxiques diminue déjà la réplication virale.

### **5.3. SÉCRÉTION DES CYTOKINES.**

Une des clés expliquant l'activation au cours des infections de la réponse immunitaire cytotoxique médiée par les lymphocytes T CD8 semble être la sécrétion cytokinique initiale des lymphocytes T helper (CD4+). En effet, une sécrétion par ces lymphocytes de cytokines TH1 (IL2, IFN $\gamma$ ) entraîne une activation des lymphocytes T CD8, elle-même inhibée par les cytokines TH2 (IL4, IL10), dont le rôle est également une activation lymphocytaire B. Il apparaissait donc important de quantifier les principales cytokines TH1 et TH2 au cours des stimulations lymphocytaires par les protéines virales, pour tenter d'expliquer les variations observées d'un malade à l'autre en terme de réponse CD8. L'objectif initial était de quantifier par cytométrie de flux multiparamétrée la sécrétion cytokinique intra-cytoplasmique des lymphocytes T activés de phénotype CD4, ceci après étape de perméabilisation cellulaire et utilisation d'anticorps fluorescents anti-cytokines. Cette technique séduisante n'a pu être utilisée d'une part compte-tenu de difficultés techniques de mises au point, et d'autre part surtout en raison de la nécessité d'utiliser de très nombreuses cellules en culture, ce qui était incompatible avec le nombre de cellules et de protéines virales disponibles. Nous avons donc choisi de doser l'IL2, l'IL4, l'IL10 et l'IFN $\gamma$  par technique ELISA dans les

surnageants du milieu de culture, principale technique utilisée dans la littérature. Ce dosage, qui présente l'avantage de sa simplicité, n'est cependant pas le reflet exact de la sécrétion cellulaire de cytokines, puisque celles-ci sont également consommées à partir du milieu par les lymphocytes activés et par certains récepteurs solubles. Elle ne permet pas par ailleurs d'identifier les cellules sécrétrices dans un milieu de culture contenant plusieurs populations cellulaires capables de sécréter des cytokines. Cette technique mesure donc la résultante entre la sécrétion et la consommation cellulaire de cytokines.

A partir des données de la littérature et de manipulations préliminaires de stimulation lymphocytaire par l'Ag HBs, nous avons choisi une durée de culture de 72h, qui semble apporter le meilleur compromis entre sécrétion et consommation. Malheureusement, nous n'avons pas eu de quantité suffisante de protéines virales pour établir de cinétique de mesure plus précise.

Le niveau d'IL2, principale cytokine mitogénique pour les lymphocytes activés, était néanmoins significativement corrélé à l'index de prolifération lymphocytaire et à l'expression membranaire de CD25. L'IL2 est également une cytokine de type I (sécritée par les lymphocytes TH1), favorisant l'activation et la prolifération des lymphocytes cytotoxiques. Il n'existait dans notre travail qu'une tendance non significative entre le niveau d'IL2 et le pourcentage de lymphocytes activés CD8+. Cette absence de significativité pourrait être expliquée par le manque de puissance de l'étude liée au faible effectif de malades. Elle pourrait également être liée à la méthode de mesure, puisque de nombreuses cellules autres que les lymphocytes CD4+ sont capables de consommer l'IL2. Ces arguments pourraient également expliquer l'absence de corrélation entre les niveaux d'IL2 et d'IFN $\gamma$ , autre cytokine du groupe TH1. La corrélation significative entre les niveaux d'IFN $\gamma$  et d'IL10 est en revanche plus difficile à expliquer. Chez la souris, l'IL10 est une cytokine TH2, dont la synthèse est inhibée par l'IFN $\gamma$  (Mosmann et al<sup>61</sup>). Chez l'homme, l'IL10 peut cependant être sécrétée à la fois par des lymphocytes TH1 et TH2. Napoli et al<sup>63</sup> ont néanmoins rapporté chez des malades atteints d'hépatite chronique C une corrélation inverse entre les niveaux d'ARNm intra-hépatiques d'IL10 et d'IFN $\gamma$  mesurés par RT-PCR quantitative. En

l'absence d'explication physiopathologique, la possibilité d'une erreur statistique de type I (conclure à tort à l'existence d'un lien significatif) ne peut être exclue, avec une probabilité de 5%.

La seule cytokine jamais détectée dans notre étude était l'IL4. La possibilité d'une erreur de manipulation a pu être écartée par la présence d'une gamme de témoins positifs dans le kit de dosage. Des résultats similaires ont été rapportés par Vingerhoets et al<sup>92</sup>, dans un travail utilisant la même méthodologie. Cependant, il s'agissait dans cette étude de patients atteints d'hépatite chronique B dont les lymphocytes périphériques étaient stimulés par les antigènes HBe et HBc. Bertoletti et al<sup>5</sup> ont cependant suggéré que les lymphocytes T CD4+ étaient plus fréquemment TH1 dans l'hépatite chronique C et plus fréquemment TH2 dans l'hépatite chronique B. Quoiqu'il en soit, la possibilité dans notre travail d'une consommation importante d'IL4 dans la culture empêchant sa détection, ou une période de stimulation inappropriée par rapport au pic de sécrétion, ne peut être écartée. Cependant, dans l'étude de Tsai et al<sup>91</sup> utilisant les mêmes méthodes, une détection d'IL4 était observée chez tous les malades après 72h de stimulation. Il s'agissait cependant de malades atteints d'hépatite virale C aiguë, non étudiés à nouveau au cours de l'évolution vers la chronicité.

Nous n'avons pas observé de corrélation entre les niveaux de cytokines TH1, IL2 et IFN $\gamma$ , et les caractéristiques de la maladie, en particulier l'activité histologique et l'activité de l'ALAT. Napoli et al<sup>63</sup> ont rapporté que la présence dans le foie des ARNm de l'IL2 et de l'IFN mesurés par RT-PCR quantitative était corrélée à l'intensité des lésions nécrotico-inflammatoires, suggérant que les cytokines TH1, pro-inflammatoires, pouvaient participer à la genèse des lésions hépatiques. Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé par Dumoulin et al<sup>20</sup>, utilisant la même technique de PCR dans le foie, chez 23 malades. La seule corrélation significative que nous avons retrouvée est la relation inverse existant entre le niveau d'IL10 et l'activité de l'ALAT.

De la même manière, les niveaux initiaux de cytokines n'étaient pas associés à la réponse au traitement. Il existait cependant une tendance en faveur de niveaux plus élevés d'IL2 et moins élevés d'IL10 chez les malades répondeurs au traitement. Aucune

différence n'était observée pour l'IFN $\gamma$ . Ces résultats sont discordants par rapport à ceux d'Iwata et al<sup>38</sup>, suggérant chez 21 patients que les répondeurs avaient des niveaux d'IFN $\gamma$  supérieurs à ceux des non répondeurs avant traitement. Néanmoins, cette différence n'était significative que lorsque les résultats étaient exprimés en index (rapport des niveaux d'IFN $\gamma$  mesurés dans le milieu de culture avec et sans stimulation), index que nous n'avons pas calculé.

Par ailleurs, aucune évolution significative des niveaux de cytokines n'a été observée après 3 mois de traitement par IFN $\alpha$ , sans différence entre répondeurs et non répondeurs. Seuls Cacciarelli et al<sup>10</sup> ont rapporté une diminution des cytokines TH2 sans modification des cytokines TH1 chez les malades répondeurs au traitement. Il s'agissait cependant dans ce travail de dosages sériques, dont la signification reste imprécise.

L'étude de la sécrétion de cytokines ne nous a donc pas permis de relier un profil de sécrétion TH1 à une réponse lymphocytaire CD8 prédominante. Ce résultat négatif pourrait être expliqué par la méthodologie employée, puisque il semble indispensable d'étudier directement les lymphocytes T activés de phénotype CD4. Les deux approches possibles pour poursuivre cette étude pourraient être d'une part une quantification des ARNm des cytokines par RT-PCR après tri des lymphocytes CD4 par CMF ou utilisation de billes magnétiques, et d'autre part le dosage des cytokines intracytoplasmiques par CMF multiparamétrée, malgré les contraintes évoquées plus haut. Une approche alternative pourrait être la recherche en CMF de marqueurs membranaires des lymphocytes CD4 spécifiques TH1 ou TH2. En effet, Loetscher et al<sup>52</sup> ont suggéré que le récepteur des chémokines CCR5 était spécifique des lymphocytes TH1, alors que Salustro et al<sup>74</sup> ont rapporté dans un modèle murin que le récepteur de l'éotaxine CCR3 était spécifique des lymphocytes TH2. Le caractère totalement discriminant de ces marqueurs devra toutefois être validé avant leur utilisation.

#### 5.4.CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons montré dans ce travail prospectif ayant inclus 20 malades atteints d'hépatite chronique C qu'il existait une activation lymphocytaire T périphérique en réponse à une stimulation in vitro par différentes protéines virales recombinantes. Cette réponse lymphocytaire, caractérisée dans 100% des cas par l'expression membranaire de marqueurs d'activation cellulaire, d'une sécrétion d'IL2, et dans 65% des cas par une réponse lymphoproliférative, suggère l'existence dans le sang périphérique de lymphocytes T spécifiques du VHC et pouvant être de phénotype CD4 ou CD8.

Nos résultats suggèrent également que les caractéristiques de cette réponse lymphocytaire sont associées à certaines caractéristiques de la maladie. En effet, l'existence d'une prolifération et d'une activation lymphocytaire intense, majoritairement de phénotype CD8, et associée à une sécrétion accrue d'IL2, était observée majoritairement chez les malades ayant une virémie faible et répondeurs immédiats au traitement par IFN $\alpha$ . Ces résultats suggèrent l'importance fondamentale de ces lymphocytes CD8, potentiellement cytotoxiques, pour permettre l'éradication du virus et la guérison de la maladie.

De nombreuses inconnues demeurent cependant: quels sont les épitopes préférentiellement reconnus par ces lymphocytes activés? Quelle est le rôle de la variabilité virale pour échapper à la reconnaissance lymphocytaire T? Les lymphocytes CD8 activés sont-ils réellement cytotoxiques? La présence d'une réponse CD8 est elle associée à une sécrétion cytokinique TH1, et quels sont les facteurs influençant cette sécrétion? Quelle est l'importance respective de la réponse lymphocytaire T en périphérie et dans le foie? De nouvelles études devront être effectuées pour mieux connaître le rôle de la réponse immunitaire de l'hôte dans l'histoire naturelle de l'hépatite virale C.

# CONCLUSION

**Évaluation de la réponse lymphocytaire T périphérique au cours de l'hépatite virale chronique C traitée par interféron alpha.**

## **CONCLUSION**

La réponse immunitaire à médiation cellulaire des malades atteints d'hépatite chronique C (HCC), qui pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'histoire naturelle de la maladie et la sensibilité au traitement par interféron alpha (IFN $\alpha$ ), reste actuellement mal connue. Le but de notre étude était donc d'analyser qualitativement et quantitativement au cours de l'HCC traitée par IFN $\alpha$  la réponse des lymphocytes T périphériques stimulés in vitro par des protéines virales C recombinantes.

**Méthodes:** Vingt malades (hommes: n=12, âge moyen: 43  $\pm$  13 ans) atteints d'HCC prouvée histologiquement ont été inclus prospectivement entre le 01/01/97 et le 01/01/98 et traités par IFN $\alpha$ , 3 MUI 3 fois par semaine pendant 12 mois. La réponse immédiate était définie par une normalisation de l'ALAT et une négativation de la virémie à 3 mois. Pour chaque malade, étaient déterminés le génotype (séquençage direct), la virémie (PCR Amplicor Monitor®), le nombre de quasi-espèces (méthode SSCP), le score de Knodell et l'index METAVIR. L'analyse immunologique était effectuée au début et après 3 mois de traitement, par mise en culture des cellules mononucléées du sang périphériques en présence des protéines virales recombinantes C22, NS3, NS4 et NS5. Après 6 jours de culture, l'intensité de la prolifération lymphocytaire était mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Le pourcentage de lymphocytes activés, identifiés en cytométrie de flux par l'expression membranaire du récepteur de l'IL2 (CD25), ainsi que leur phénotype CD4/CD8 ont été déterminés. La sécrétion lymphocytaire de cytokines (IL2, IL4, IL10 et IFN $\gamma$ ) était évaluée après 72h par technique ELISA dans les surnageants de culture.

**Résultats:** Une réponse lymphoproliférative significative était observée dans 65% des cas, en particulier dirigée contre NS4 et C22 (50%). Les profils de réponse n'étaient cependant pas corrélés aux caractéristiques de la maladie. Une activation lymphocytaire détectée en cytométrie de flux par l'expression membranaire de CD25 était observée chez tous les malades (moyenne: 21%, extrêmes: 11 - 52%). Les lymphocytes activés pouvaient être de phénotype CD4 (21% - 58%) ou CD8 (16% - 75%), avec un rapport CD4/CD8 moyen de  $1,2 \pm 0,9$ . Ce rapport était significativement corrélé à la virémie des malades ( $r=0,55$ ;  $p<0,01$ ), mais non à l'activité histologique et à l'activité des ALAT. Des concentrations significatives d'IL2, d'IL10, d'IFN $\gamma$ , mais non d'IL4 étaient détectées dans les milieux de culture. La concentration d'IL2 était plus élevée en cas de prolifération et d'activation lymphocytaire intense, mais les concentrations d'IL10 et d'IFN $\gamma$  n'étaient pas corrélées aux caractéristiques de la maladie.

Une réponse immédiate à l'IFN $\alpha$  a été observée chez 10 malades. Ceux-ci avaient une prolifération lymphocytaire plus intense (index de stimulation:  $33 \pm 45$  vs  $8 \pm 6$ ,  $p<0,05$ ), une concentration d'IL2 plus élevée ( $16 \pm 20$  vs  $8 \pm 5$  pg/ml,  $p=0,14$ ) et un rapport CD4/CD8 plus bas ( $0,7 \pm 0,3$  vs  $2,0 \pm 1,3$ ) que les non répondeurs. En analyse multivariée, seule la présence d'un rapport CD4/CD8 $<1$  était prédictive de la réponse immédiate au traitement (RR:8,2; IC95%: 2,1-60,5;  $p<0,05$ ).

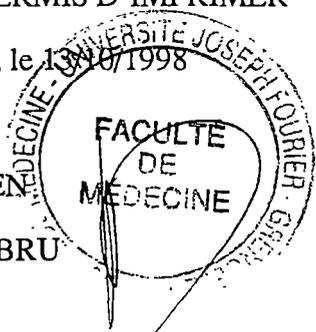
**Conclusion:** Nos résultats suggèrent l'importance de la réponse lymphocytaire T périphérique dirigée contre le VHC. En particulier, la réponse CD8, potentiellement cytotoxique, pourrait réduire la virémie et favoriser la réponse au traitement par IFN $\alpha$ . Ces résultats devront cependant être confirmés par de plus larges études, appréciés en terme de réponse soutenue, et comparés à la réponse lymphocytaire T intra-hépatique.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 13/10/1998

LE DOYEN

Pr JL DEBRU



LE PRESIDENT DE THESE

Pr J FOURNET

# REFERENCES

## 7. REFERENCES

1. **ALRIC L, FORT M, IZOPET J et al.** Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1997; 113: 1675-81.
2. **ALTER M, MARGOLIS H, KRAWCZYNSKI K et al.** The natural history of community-acquired hepatitis C in the united states. *N Engl J Med* 1992; 327: 1899-905
3. **ANGELINI G, SGARBI D, COLOMBARI R et al.** Alpha-interferon treatment of chronic hepatitis C: a controlled, multicentre, prospective study. *Digestion* 1995; 56: 199-203.
4. **BENVEGNI L, PONTISSO P, CAVALLETTO D, NOVENTA F, CHEMELLO L, ALBERTI A.** Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-Related cirrhosis. *Hepatology* 1997; 25: 211-15.
5. **BERTOLETTI A, D'ELIOS MM, BONI C et al.** Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997; 112 : 193-9.
6. **BOHM W, SCHIRMBECK R, ELBE A et al.** Exogenous hepatitis B surface antigen particles processed by dendritic cells or macrophages prime murine MHC class I restricted cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Immunol* 1995; 155: 3313-21.
7. **BOTARELLI P, BRUNETTO MR, MINUTELLO MA et al.** T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104 : 580-7.
8. **BRILLANTI S, FOLI M, GAIANI S et al.** Persistent hepatitis C viraemia without liver disease. *Lancet* 1993, 341: 464-5.
9. **BRONOWICKI JP, VETTER D, UHL G et al.** Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients. *J Infect Dis* 1997; 176 : 518-22.

10. **CACCIARELLI TV, MARTINEZ OM, GISH RG, VILLANUEVA JC, KRAMS SM.** Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection : pre and post-treatment with interferon alfa. *Hepatology* 1996; 24 : 6-9.
11. **CAMMÀ C, GIUNTA M, LINEA C, PAGLIARO L.** The effect of interferon on the liver in chronic hepatitis C: a quantitative evaluation of histology by meta-analysis. *J Hepatol* 1997; 26: 1187-99.
12. **CAMPS J, CASTILLA O, UIZ J, CIVEIRA M, PRIETO J.** Randomised trial of lymphoblastoid a-interferon in chronic hepatitis C. Effects on inflammation, fibrogenesis and viremia. *J Hepatol* 1993; 17: 390-396.
13. **CAUSSE X and the multicenter study group.** Chronic hepatitis C should be treated even among HIV patients. A prospective multicenter study conducted in France. *Hepatology* 1997; 26: 312A (abstract).
14. **CERNY A, McHUTCHISON JG, PASQUINELLI C et al.** Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA A2.1 binding motif. *J Clin Invest* 1995; 95 : 521-30.
15. **CRAMP ME, ROSSOL S, CHOKSHI S, CARUCCI P, WILLIAMS R, NAOUMOV NV.** Interferon induced virus specific T helper cell responses are associated with viral clearance in chronic HCV infection. *Hepatology* 1997;26: 1111A.
16. **DAVID M, LARNER A.** Activation of transcription factors by interferon alpha in a cell-free system. *Science* 1989; 257: 813-15.
17. **DIBISCEGLIE AM, GOODMAN ZD, ISHAC KG et al.** Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 1991; 14: 969-74.
18. **DIEPOLDER HM, ZACHOVAL R, HOFFMANN RM et al.** Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346 : 1006-7.

19. **DUBOIS F, DESENCLOS JC, MARIOTTE N, GOUDEAU A and the collaborative study group.** Hepatitis C in a french population-based survey, 1994: seroprevalence, frequency of viremia, genotype distribution, and risk factors. *Hepatology* 1997; 25: 1490-96.
20. **DUMOULIN FL, BACH A, LEIFELD L et al.** Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1997; 175 : 681-5.
21. **ECKELS DD, FLOMENBERG P, GILL JC.** Hepatitis C virus: models of immunopathogenesis and prophylaxis. *Transfusion* 1996; 36:836-844.
22. **ENOMOTO N, SAKUMA I, ASAHINA Y et al.** Mutations in the non structural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 77-81.
23. **FARCI P, ALTER HJ, WONG DC et al.** Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7792-6.
24. **FERRARI C, CHISARI FV.** Immune mechanisms of cellular injury in viral hepatitis. in *The Liver: biology and pathobiology*, eds IM Arias. New York: Raven 1994; 1413-27.
25. **FERRARI C, VALLI A, GALATI L et al.** T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology* 1994; 19 : 286-95.
26. **FONG TL, VALINLUCK B, GOVINDARAJAN S et al.** Short-term prednisone therapy affects aminotransferase activity and hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107: 196-9.
27. **FRIEDMAN S.** The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 24: 1828-35.
28. **GAVIER B, MARTINEZ-GONZALEZ MA, RIEZU-BOJ JI et al.** Viremia after one month of interferon therapy predicts treatment outcome in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 113: 1647-53.

29. **GERLACH JT, DIEPOLDER HM, GRÜNER NH et al.** Acute hepatitis C : viral elimination depends on virus-specific CD4+ T cells. *Hepatology* 1997; 26 : 405A.
30. **GERMAIN RN.** MHC-dependent antigen processing and peptide presentation : providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76 : 287-99.
31. **GONZALES-PERALTA R, DAVIS G, LAU J.** Pathogenic mechanisms of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1994; 21: 255-259.
32. **GRELLIER L, KHAKOO S, WELLS B et al.** CD4 positive T lymphocyte proliferative responses in a cohort of patients with chronic hepatitis C virus treated with ribavirin and interferon. *Hepatology* 1997;26: 1112A.
33. **HEINZEL FP, SADICK MD, HOLADAY BJ et al.** Reciprocal expression of interferon or IL4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis: evidence for expansion of distinct T helper cell subsets. *J Exp Med* 1989; 169: 59-72.
34. **HIROISHI K, KITA H, KOJIMA M et al.** Cytotoxic T lymphocyte response and viral load in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997; 25 : 705-12.
35. **HOFFMANN RM, DIEPOLDER HM, ZACHOVAL R et al.** Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* 1995; 21 : 632-8.
36. **HOHLER T, GERKEN G, NOTGHI A et al.** MHC class II genes influence the susceptibility to chronic active hepatitis C. *J Hepatol* 1997; 27: 259-64.
37. **IDEKA K, SAITO S, KOIDA I et al.** A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 47-53.
38. **IWATA K, WAKITA T, OKUMURA A et al.** Interferon gamma production by peripheral blood lymphocytes to hepatitis C virus core protein in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 1995; 22 : 1057-64.

39. **JEFFERS LJ, BANKS AT, JONNALAGADDA S et al.** E1 antibody level monitoring predicts long term response of hepatitis C virus infection in patients treated with interferon. *Hepatology* 1995; 22: 291A (abstract)
40. **JIMENEZ S, FREUNDLICH B, ROSENBLOOM J.** Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *J Clin Invest* 1984; 74: 1112-16.
41. **JOUVIN-MARCHE E, VIGAN I, DELACHANAL E et al.** Analysis of T cell antigen receptor diversity in intrahepatic T lymphocytes of chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 1997, 26: 533A (abstract)
42. **KERN F, SUREL IP, BROCK C et al.** T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nature Med* 1998; 4: 975-8.
43. **KNODELL K, ISHAK K, BLACK W et al.** Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 5: 431-5.
44. **KORETZ RL, STONE O, MOUSA M, GITNICK GL.** Non-A, non-B posttransfusion hepatitis. A decade later. *Gastroenterology* 1985; 88: 1251-4.
45. **KOZIEL MJ, DUDLEY D, AFDHAL N et al.** HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of Multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J Clin Invest* 1995; 96 : 2311-21.
46. **KOZIEL MJ, WONG DKH, DUDLEY D, HOUGHTON M, WALKER BD.** Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte (CTL) and T helper cell responses in seronegative individuals. *Hepatology* 1997;26: 1110A.
47. **LAU J, DAVIS G, PRESCOTT L et al.** Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the united states. *Ann Intern Med* 1996; 124: 868-76.

48. **LECHMANN M, IHLENFELDT HG, BRAUNSCHWEIGER I et al.** T- and B-cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus-positive blood donors without viremia. *Hepatology* 1996; 24 : 790-5.
49. **LECHMANN M, LANGHANS B, BÄR S et al.** Deficient secretion of TH1 cytokines in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26 : 21A.
50. **LEROUX-ROELS G, ESQUIVEL CA, DELEYS R et al.** Lymphoproliferative responses to hepatitis C virus core, E1, E2, and NS3 in patients with chronic hepatitis C infection treated with interferon alfa. *Hepatology* 1996; 23 : 8-16.
51. **LIN R, ROACH E, ZIMMERMANN M, STRASSER S, FARRELL GC.** Interferon alpha-2b for chronic hepatitis C: effects of dose increment and duration of treatment on response rates. *J Hepatol* 1995; 23: 487-96.
52. **LOETSCHER P, UGUCCIONI M, BORDOLI L et al.** CCR5 is characteristic of TH1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344-5.
53. **MANGIA A, MAERTENS G, CASCAVILLA I et al.** Circulating E1 and E2 antibodies in HCV chronic carriers. *Hepatology* 1997; 26: 213A (abstract).
54. **MARCELLIN P, BOYER N, GERVAIS A et al.** Long-term histological improvement and loss of detectable intra-hepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon alpha therapy. *Ann Intern Med* 1997; 127: 875-81.
55. **MARCELLIN P, BOYER N, GIOSTRA E et al.** Recombinant human alpha-interferon in patients with chronic non-A, non-B hepatitis: a multicenter randomized controlled trial from France. *Hepatology* 1991; 13: 393-97.
56. **MARTINOT-PEIGNOUX M, MARCELLIN P, POUTEAU M et al.** Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 22: 1050-6.

57. **MINUTELLO MA, PILERI P, UNUTMAZ D et al.** Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: Intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* 1993; 178:17-25.
58. **MISSALE G, CARIANI E, LAMONACA V et al.** Effects of interferon treatment on the antiviral T-cell response in hepatitis C virus genotype 1b- and genotype 2c- infected patients. *Hepatology* 1997; 26 : 792-7.
59. **MORIBE T, HAYASHI N, KANAZAWA Y et al.** Hepatitis viral complexity detected by single-strand conformation polymorphism and response to interferon therapy. *Gastroenterology* 1995; 108: 789: 95.
60. **MOSNIER JF, SCOAZEC JY, MARCELLIN P et al.** Expression of cytokine-dependant immune adhesion molecules by hepatocytes and bile duct cells in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107: 1457-68.
61. **MOSSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW.** Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
62. **NAGAYAMA R, MIYAKE K, TSUDA F, OKAMOTO H.** IgM antibody to a hepatitis C virus core peptide for monitoring activity of liver disease in patients with acute or chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1994; 42: 311-7.
63. **NAPOLI J, BISHOP GA, McGUINNESS PH, PAINTER DM, McCAUCHAN GW.** Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24 : 759-65.
64. **NELSON DR, MAROUSIS CG, DAVIS GL et al.** The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol* 1997; 158 : 1473-81.
65. **NELSON DR, MAROUSIS CG, OHNO T, DAVIS GL, LAU JYN.** Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28 : 225-30.

66. **NING Q, BROWN D, PARODO J et al.** Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998; 160 : 3487-93.
67. **OGG GS, JIN X, BONHOEFFER S et al.** Quantification of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998; 279: 2103-5.
68. **POYNARD T, BEDOSSA P, OPOLON P et al.** Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349: 825-32.
69. **POYNARD T, LEROY V, COHARD M et al.** Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology* 1996; 24: 778-89.
70. **REHERMANN B, CHANG KM, McHUTCHISON JG, KOKKA R, HOUGHTON M, CHISARI FV.** Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 1996; 98 : 1432-40.
71. **REHERMANN B, CHANG KMI, McHUTCHISON J et al.** Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996; 70 : 7092-102.
72. **REHERMANN B, TAKAKI A, LIEBETRAU A et al.** Characterization of the cytotoxic and helper T cell response in patients 18 years after a single source outbreak of HCV infection. *Hepatology* 1997;26: 1109A.
73. **REISER M, MAROUSIS CG, NELSON DR et al.** Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1997; 26 : 471-8.
74. **SALLUSTO F, MACKAY CR, LANZAVECCHIA A.** Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997; 227: 2005-7.

75. **SAROBÉ P, JAUREGUI JI, LASARTE JJ et al.** Production of interleukin-2 in response to synthetic peptides from hepatitis C virus E1 protein in patients with chronic hepatitis C : relationship with the response to interferon treatment. *J Hepatol* 1996; 25 : 1-9.
76. **SCHLAAK JF, LÖHR HF, PITZ T, GERKEN G, MEYER Z, BÜSCHENFELDE KH.** IL-12 boosts deficient TH1-type immune response against HCV-antigens. Evidence for IL-12 responders and non-responders. *Hepatology* 1997; 26 : 25A.
77. **SCHLUGER LK, SHEINER PA, THUNG SN et al.** Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1996; 23: 971-6.
78. **SCHUPPAN D, STÖLZEL U, OESTERLING C, SOMASUNDARAM R.** Serum assays for liver fibrosis. *J Hepatol* 1995; 22 (Suppl. 2): 82-88.
79. **SCHUPPER H, HAYASHI P, SCHEFFER J et al.** Peripheral-blood mononuclear cell responses to recombinant hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1993; 18 : 1055-60.
80. **SCHWARTZ RS.** Direct visualization of antigen-specific cytotoxic T cells. A new insight into immune defenses. *N Engl J Med* 1998, 339: 1076-8.
81. **SEEFF L, BUSKELL-BALES Z, WRIGHT E et al.** Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1992; 327: 1906-11.
82. **SERFATY L, AUMAITRE H, CHATOUILLÈRES O, MORAND-JOUBERT L, PETIT JC, POUPON R.** Risk factors for cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. Results of a case control study. *Hepatology* 1997; 26: 776-9.
83. **SERFATY L, NOUSBAUM JB, ELGHOZZI MH, GIRAL P, LEGENDRE C, POUPON R.** Prevalence, severity and risks factors of liver disease in blood donors positive in a second-generation anti-hepatitis C virus screening test. *Hepatology* 1995; 20: 725-9.

84. **SHINDO M, HAMADA K, KOYA S, ARAI K, SOKAWA Y, OKUNO T.** The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* 1996; 24: 1018-23.
85. **STENGER S, MODLIN RL.** Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *J Immunol* 1998; 10/ 471-17.
86. **TANIGUCHI S, OKAMOTO H, SAKAMOTO M et al.** A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 1993; 195: 297-301.
87. **The french METAVIR cooperative study group.** Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; 20: 15-20.
88. **THOMAS H, FOSTER G.** Treatment of hepatitis C with interferon: mechanism of action of interferon. In : Abstract book of the 1993 international symposium on viral hepatitis and liver disease (the 8th triennial congress). Tokyo 1993; 594-600.
89. **TILG H, WILMER A, VOGL W et al.** Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992; 103 : 264-74.
90. **TONG MJ, EL-FARRA NS, REIKES R, CO RL.** Clinical outcome after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995; 332: 1463-6.
91.  **TSAI SL, LIAUW YF, CHEN MH, HUANG CY, KUO GC.** Detection of type2-like T-Helper cells in hepatitis C virus infection : implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25 : 449-58.
92. **VINGERHOETS J, MICHIELSEN P, VANHAM G et al.** HBV-specific lymphoproliferative and cytokine responses in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1998; 28 : 8-16.
93. **WEINER A, ERICKSON AL, KANSOPON J et al.** Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92 : 2755-9.

94. **WIJBURG OL, VAN DEN DOBBELSTEEN GP, VADOLAS J et al.** The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens. *Eur J Immunol* 1998; 28: 479-87.
95. **WOITAS RP, LECHMANN M, JUNG G, KAISER R, SAUERBRUCH T, SPENGLER U.** CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* 1997; 159 : 1012-8.
96. **YAMAMURA M, UYEMARA K, DEANS RJ et al.** Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254: 277-9.
97. **YAMASHIKI M, NISHIMURA A, SAKAGUCHI S, NOBORI T.** Subtype 1 (TH1, TC1) in circulating T lymphocytes is dominant in chronic hepatitis B and subtype 2 (TH2, TC2) is dominant in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 114 : A1368.
98. **YANG PM, HWANG LH, LAI MY et al.** Prominent proliferative response of peripheral blood mononuclear cells to a recombinant non-structural (NS3) protein of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol* 1995; 101 : 272-7.
99. **ZIGNEGO AL, MACCHIA D, MONTI M et al.** Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 1992; 15: 382-6.

# ANNEXES



**COMITE CONSULTATIF DE PROTECTION DES PERSONNES  
DANS LA RECHERCHE BIOMEDICALE GRENOBLE 2**

Président : L. BARRET  
Vice-Président : E. CHEVRIER  
Trésorier : P. ROUSSILLON  
Secrétaire : G. RABATEL

Téléphone : 04.76.76.57.83  
Télécopie : 04.76.76.51.77

C.H.U. B.P. 217 - 3è étage Unité D - 38043 - GRENOBLE Cedex 9

---

Monsieur J.P. ZARSKI  
C.H.U.  
B.P. 217  
38043 Grenoble Cedex 9

22. Réf. : Néant  
Nos Réf. : 96/APTF/2/C2

Objet : Avis

La Tronche, le 20 décembre 1996

Monsieur,

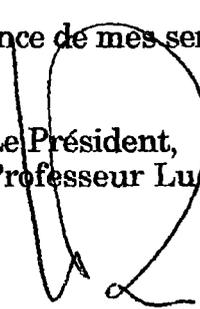
Le Président, au nom du Comité, a donné un avis **FAVORABLE**, en date du 20 décembre 1996 pour le protocole intitulé :

**Etude de la réponse immunitaire chez les malades porteurs d'une hépatite virale chronique C au cours d'un traitement par interféron alpha.**

après consultation des rapporteurs et examen par le Comité en sa séance du 11 décembre 1996.

Protocole sans bénéfice individuel direct, dont le promoteur est l'association pour la Prévention et le Traitement des maladies du Foie et des Cancers digestifs (A.P.T.F.C.).

Je vous prie de croire, Monsieur, à l'assurance de mes sentiments les meilleurs.

  
Le Président,  
Professeur Luc BARRET

**Annexe 3: Caractéristiques individuelles des malades lors de l'inclusion dans l'étude**

Malade (n)	Age (ans)	Sexe	Mode de contamination	Durée du portage	ALAT (n)	Génotype	Virémie (10 <sup>5</sup> cop/ml)	Quasi- especies	Score de Knodell
1	39	M	Toxicomanie IV	16	4,33	3a	4,2	8	3
2	44	F	Transfusion	16	2,23	3a	0,6	7	6
3	56	M	Inconnu	-	16,6	1b	0,1	9	6
4	34	M	Toxicomanie IV	16	1,1	3a	2,0	7	8
5	44	F	Transfusion	19	5,5	1b	0,3	10	5
6	30	M	Toxicomanie IV	10	1,1	1a	1,1	12	5
7	38	M	Toxicomanie IV	11	3,14	3a	1,2	8	5
8	39	F	Toxicomanie IV	13	1,03	3a3c	0,8	-	5
9	38	F	Inconnu	11	0,92	2a	1,2	-	8
10	43	M	Toxicomanie IV	23	3,4	1a	0,4	9	12
11	33	M	Toxicomanie IV	-	1,17	1a	3,4	4	8
12	55	F	Transfusion	16	1,7	1b	5,1	-	8
13	45	M	Transfusion	35	2,36	1b	1,5	8	9
14	45	F	Toxicomanie IV	27	9,9	3a	2,3	-	10
15	38	M	Inconnu	-	1,44	1b	3,2	6	5
16	59	M	Transfusion	38	3,29	1b	3,7	9	8
17	40	M	Transfusion	22	1,5	1b	6,7	-	5
18	54	M	Transfusion	19	2,78	1a	2,1	10	10
19	37	F	Inconnu	-	1,1	1b	0,1	9	8
20	39	F	Toxicomanie IV	14	0,83	4a	0,1	-	5

Annexe 4: Caractéristiques individuelles de l'activation lymphocytaire des malades avant traitement par IFN $\alpha$

Malade	Réponse à l'IFN $\alpha$	Prolifération lymphocytaire*					Cytométrie de flux			
		NS3	NS4	NS5	C22	Pool	SOD	% CD25 +	CD4/CD8 (CD 25 -)	CD4/CD8 (CD25 +)
1	R	26,9	66,8	65,9	7,3	119,5	0,9	54	2,1	0,9
2	R	1,8	3,7	6,8	2,6	12,9	3,8	-	-	-
3	R	8,7	4,8	3,7	5,6	5,2	1,8	-	-	-
4	R	8,7	13,0	19,8	23,3	46,1	5,6	21	3,7	0,4
5	R	2,1	4	5,1	11,6	5,1	4,4	18	4,4	0,3
6	R	1,9	1,1	1,7	1,3	1,6	1,0	23	1,3	0,8
7	R	4,7	6,8	13,8	8,5	9,1	2,3	26	2,4	1,2
8	R	0,6	1,8	1,9	1,5	7,6	1,2	18	2,4	0,6
9	R	2,9	3,1	7,5	6,1	4,2	1,5	-	-	-
10	R	1,2	2,1	1,3	2,7	1,8	1,5	18	1,4	0,7
11	NR	3,8	4,8	6,7	4,0	4,0	4,4	25	3,2	1,1
12	NR	1,1	1,4	1,2	1,1	1,4	0,4	25	2,4	2,0
13	NR	1,4	1,6	1,7	1,8	1,5	1,4	-	-	-
14	NR	2,1	15,3	3,2	10,6	20,2	0,8	21	1,9	3,2
15	NR	3,3	4,7	3,3	1,0	5,1	2,2	16	2,1	0,9
16	NR	3,8	4,6	0,7	6,7	7,5	1,2	22	3,7	2,9
17	NR	1,6	12,8	2,6	5,8	7,6	1,4	-	-	-
18	NR	1,5	2,2	1,2	0,8	1,8	0,4	18	2,8	1,2
19	-	3,1	3,5	1,7	1,8	2,4	1,5	18	6,2	1,1
20	-	4	1,6	4,4	11,9	8,7	0,7	17	1,9	0,9

\*: Résultats exprimés en index de stimulation.

# ABBREVIATIONS

## ABREVIATIONS

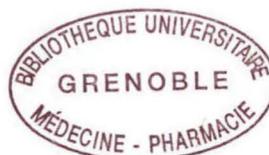
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine amino-transférase
Ag HBs	Antigène HBs
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CD	Cluster differentiation
CMF	Cytométrie de flux
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Cy5	Cyanine 5
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
HBSS	Hans balanced salt solution
HLA	Human leucocyte antigen
IC	Intervalle de confiance
IFN	Interferon
IL	Interleukine
NK	Natural killer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrine
SVNN	Sérum de veau nouveau-né
TGF	Transforming growth factor
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immuno-déficiencce humaine

# TABLE DES MATIERES

<b>1.INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>2. RAPPELS THEORIQUES.....</b>	<b>8</b>
2.1. LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC).....	8
2.2. HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION PAR LE VHC.....	9
2. 3. PHYSIOPATHOLOGIE.....	10
2.4. REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-VIRALE C.....	11
2.4.1. Mécanismes généraux de l'immunité antivirale.....	11
2.4.1.1. <i>Effecteurs de la réponse immunitaire</i>	12
2.4.1.2. <i>Régulation. Rôle des cytokines TH1/TH2 .</i>	13
2.4.2. Immunité anti-virale C	15
2.4.2.1. <i>Réponse immunitaire humorale</i>	15
2.4.2.2. <i>Réponse immunitaire cellulaire</i>	16
2.4.2.1. <i>Réponse cytokinique</i>	17
2.5. TRAITEMENT PAR IFN $\alpha$ DE L'HEPATITE CHRONIQUE C.....	18
2.5.1. Les interférons (IFN).....	18
2.5.2 Mécanismes d'action de l'IFN $\alpha$ .....	18
2.5.3 Efficacité de l'IFN $\alpha$ .....	18
2.5.4. Facteurs prédictifs de réponse à l'IFN $\alpha$	20
<b>3. MALADES ET METHODES.....</b>	<b>22</b>
3.1. MALADES.....	22
3.2. PROTOCOLE THERAPEUTIQUE.....	22
3.3. MARQUEURS BIOLOGIQUES DU VHC.....	23
3.4. HISTOLOGIE HEPATIQUE.....	24
3.5. ANALYSE IMMUNOLOGIQUE.....	24
3.5.1. Antigènes recombinants du VHC.....	24
3.5.2. Cellules .....	25
3.5.3 Milieu de culture.....	25
3.5.4. Mesure de la prolifération lymphocytaire.....	26
3.5.5. Cytométrie de flux.....	26

3.5.6. Dosage des cytokines.....	27
3.6. ANALYSE STATISTIQUE.....	28
<b>4.RESULTATS.....</b>	<b>30</b>
4.1. CARACTÉRISTIQUES DES MALADES .....	30
4.2. RÉPONSE LYMPHOPROLIFÉRATIVE.....	33
4.2.1 Analyse des index de stimulation.....	33
4.2.2. Spécificité de la réponse proliférative.....	34
4.2.3. Corrélations avec la réponse humorale.....	34
4.2.4. Corrélations avec les caractéristiques des malades.....	34
4.2.5. Corrélations avec la réponse au traitement.....	36
4.3. CYTOMÉTRIE DE FLUX.....	38
4.3.1. Activation lymphocytaire.....	38
4.3.2. Phénotypage CD4/CD8.....	38
4.3.3. Corrélations avec la réponse au traitement.....	42
4.3. DOSAGE DES CYTOKINES.....	46
4.3.1. Corrélations avec les paramètres immunologiques.....	46
4.3.2. Corrélations avec les caractéristiques de la maladie.....	46
4.3.3. Corrélations avec la réponse au traitement.....	47
4.4. FACTEURS PREDICTIFS DE REPONSE AU TRAITEMENT.....	47
<b>5. DISCUSSION.....</b>	<b>51</b>
5.1. RECHERCHE DE LYMPHOCYTES SPÉCIFIQUES DU VHC	51
5.1.1. Détection d'une prolifération lymphocytaire.....	51
5.1.1.1. <i>Aspects méthodologiques</i>	52
5.1.1.2. <i>Corrélations avec la réponse humorale</i>	55
5.1.1.3. <i>Corélations avec les caractéristiques de la maladie...</i>	56
5.1.1.4. <i>Corrélations avec la réponse au traitement.....</i>	57
5.1.2. Détection d'une activation lymphocytaire	58
5.2. IDENTIFICATION DU PHÉNOTYPE DES LYMPHOCYTES	59
5.2.1. Interprétation des résultats	59

5.2.2. Corrélation avec les caractéristiques de la maladie.....	61
5.2.3. Corrélation avec la réponse au traitement.....	63
5.3. SÉCRÉTION DES CYTOKINES.....	64
5.4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	68
6. CONCLUSION.....	70
7. RÉFÉRENCES	73
8. ANNEXES	84
9. ABREVIATIONS	90





## SERMENT D'HIPPOCRATE

Qui diis memorem laudes, reperimque fideles  
 Ingenij dotes, Hippocratusque decus.  
 Democriti auditor Phœbea, ô, Coe propago,  
 Certeus an quis te tradidit artis opes?

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

