

Université de Montréal

Étude du goulot d'étranglement dans la transmission mère-enfant du virus de l'hépatite C

Par

Sébastien Fauteux-Daniel

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. Sc.)

en microbiologie et immunologie

Septembre 2014

© Sébastien Fauteux-Daniel, 2014

Résumé

La transmission mère-enfant (TME) du virus de l'hépatite C (VHC) est la première cause d'acquisition de l'infection chez les enfants des pays développés. Celle-ci prend place dans <10% des cas. Toutefois, dans le cas d'une coinfection maternelle avec le virus de l'immunodéficience de type 1 (VIH-1), ce taux est accru alors qu'il n'existe aucune intervention préventive de la TME du VHC. Le VHC arbore une diversité importante qui est le résultat d'une réplication exempte de mécanisme de correction. Il est donc retrouvé chez son hôte sous la forme d'un spectre de virions génétiquement apparentés mais différents qu'on appelle quasiespèce. Lorsque le VHC est transmis entre adultes, seulement un nombre limité de variantes sont responsables de l'infection, c'est ce qu'on appelle un goulot d'étranglement génétique. L'existence d'un tel profil de transmission lors de la TME du VHC restait, jusqu'à maintenant, à confirmer. En se basant sur la détection par RT-PCR de la virémie à la naissance, la TME du VHC est réputée prendre place *in utero* et *peripartum*, une dynamique de transmission qui reste à démontrer.

Ici, nous rapportons une analyse longitudinale de la TME du VHC par séquençage de nouvelle génération chez 5 paires mère-enfant dont 3 mères sont également coinfectées avec le VIH-1. L'analyse de l'identité des variantes virales basée sur la séquence nucléotidique des régions hypervariables 1-2 de la glycoprotéine E2 (positions 1491-1787 de l'isolat H77) révèle qu'un nombre limité de variantes virales sont transmises de la mère à l'enfant lorsque la mère est seulement infectée par le VHC (n = 1-4 variantes transmises). Dans le cas de la coinfection maternelle avec le VIH-1, ce nombre est toutefois drastiquement plus important (n = 111-118). La détection de variantes retrouvées chez la mère au deuxième trimestre et l'enfant mais non détectées subséquemment chez la mère témoigne que la TME du VHC peut prendre place aussi tôt que lors du deuxième trimestre de grossesse. Finalement, nous montrons que la dynamique d'infection chez l'enfant implique une augmentation transitoire de la virémie concomitante avec une perte de diversité de la quasiespèce. Dans l'ensemble ces résultats sont les premiers à démontrer directement l'existence d'un goulot d'étranglement lors de la TME du VHC. Celui-ci serait moins restrictif dans le cas de la coinfection maternelle avec le VIH-1. Cette transmission peut prendre place aussi tôt que lors du deuxième trimestre de grossesse et il semblerait qu'un spectre limité de variantes soit responsable pour l'établissement de l'essentiel de la production virale chez le jeune enfant.

Mots clés : Transmission, VHC, VIH-1, mère, enfant, goulot d'étranglement, quasiespèce

Abstract

Mother-to-child transmission (MTCT) of hepatitis C virus (HCV) represents the first cause of infection in children of developed countries. MTCT of HCV may take place in <10% when the mother is solely infected with HCV. However, maternal coinfection with type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) leads to a drastic increase of this rate. Besides, there is no mean of prevention of MTCT of HCV.

HCV replication leads to a prominent variability due to the absence of correction mechanism of its RNA-dependent RNA polymerase. Consequently, it is retrieved in its host as a swarm of genetically closely related but different variants named quasispecies. When HCV transmission occurs between adults, only a very limited number of variants are responsible for the infection. This phenomenon is called a genetic bottleneck and whether it exists during MTCT of HCV is to confirm. Based on the detection by RT-PCR of HCV's RNA at birth, MTCT is believed to take place both *in utero* and *peripartum*. Nevertheless, such dynamics of MTCT of HCV have never been demonstrated directly.

Here we report, using next generation sequencing, a longitudinal analysis of MTCT of HCV in 5 mother-child pairs, in 3 cases the mother was also infected with HIV-1. Identity analysis based on nucleotide sequence of the glycoprotein E2 hypervariable regions 1-2 (positions 1491-1787 of the isolate H77) reveals that a tight genetic bottleneck exists during MTCT of HCV (n= 1-4 variants transmitted) when the mother is only infected with HCV. However, in the case of maternal coinfection with HIV-1, this number is radically increased (n = 111-118). Also, the detection of variants shared between mother and child that are only present at the 2nd trimester of pregnancy in the mother but not found after suggest that MTCT of HCV can take place as early as the 2nd trimester of gestation. Lastly, we show that the dynamics of the establishment of the infection in the young child involve a transitional increase of the viremia concomitant with reduced diversity of HCV quasispecies. Together, these results show the first direct evidence of a genetic bottleneck occurring during MTCT of HCV. This bottleneck appears to be much less constricted when the mother is coinfecting with HIV-1 and HCV. It appears possible that the MTCT can take place as early as the second trimester of pregnancy and that a limited number of variants may be responsible for the essential of the viral production during early childhood.

Keywords : Transmission, HCV, HIV-1, mother, child, genetic bottleneck, quasispecies

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des annexes	x
Liste des abréviations	xi
1. Introduction	1
1.1 Épidémiologie	1
1.2 Facteurs de risque.....	1
1.3 Histoire naturelle	2
1.3.1 Pathogénèse chez l'adulte	2
1.3.2 Transmission mère-enfant.....	3
1.3.3 Pathogénèse chez l'enfant.....	3
1.3.4 Immunité anti-VHC de l'enfant.....	4
1.4 Hypothèses du passage du VHC à l'interface maternofoetale	4
1.5 Coïnfection avec le VIH-1.....	7
1.6 Pharmacopée contemporaine	8
1.7 Virologie.....	9
1.7.1 Origine du VHC.....	9
1.7.2 Généralités.....	10
1.7.3 Cycle de réplication.....	10
1.8 Quasispéciation.....	14
1.8.1 Quasispéciation des virus pathogènes humains.....	14
1.8.2 Quasispéciation du VHC.....	15
1.8.3 Hypervariabilité	15
1.9 Phylogénie.....	16
1.9.1 Évolution moléculaire	16
1.9.2 Modélisation de l'évolution moléculaire	17
1.10 Goulot d'étranglement	18
1.11 Le goulot d'étranglement lors de la transmission mère-enfant du VHC	20
1.12 Hypothèses et objectif.....	20

2. Article.....	22
Contribution à l'article	22
CHARACTERIZATION OF THE TRANSMISSION BOTTLENECK IN MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION OF HEPATITIS C VIRUS (HCV).....	23
ABSTRACT	24
INTRODUCTION.....	25
RESULTS	27
HCV-infected women and their HCV-infected children share large numbers of viral variants.....	27
Mother-to-child transmission of HCV can take place in utero as early as the second trimester of gestation.	28
Evolution of HCV quasispecies in the first year of life in children infected by MTCT	30
DISCUSSION	30
MATERIALS AND METHODS.....	34
Study subjects.....	34
Viral RNA extraction and amplification.	35
Next generation sequencing (NGS).....	35
Analysis of nucleic acid sequence data.....	36
Phylogenetic analysis.....	37
ACKNOWLEDGEMENTS.....	37
REFERENCES.....	38
FIGURE LEGENDS	48
SUPPLEMENTAL MATERIALS.....	53
3. Discussion	60
3.1 Goulot d'étranglement génétique lors de la TME du VHC	61
3.2 De nombreuses variantes peuvent être transmises de la mère à l'enfant.....	62
3.3 Dynamique d'établissement de l'infection au VHC chez l'enfant.....	63
3.4 Un second goulot d'étranglement chez l'enfant	64
3.5 La TME du VHC peut prendre place <i>in utero</i>	65
3.6 Radiation génétique lors de la TME du VHC	65
3.7 Transmission du VHC de l'enfant à la mère	66
3.8 Difficultés rencontrées.....	66
Conclusion.....	70
Bibliographie.....	71

Annexes.....	78
Annexe 1 : CD-ROM	78
Annexe 2 : Schéma expérimental A) <i>in vitro</i> et B) <i>in silico</i>	79

Liste des tableaux

Table 1. Clinical information on the study subjects.....p.42

Table 2. Genotype specific primers and control primers.....p.51

Liste des figures

Chapitre 1

Introduction

- Figure 1. Représentation schématique d'un villi placentaire et des possibles modes de transmission du VHC à l'interface maternofoetale.....p.7
- Figure 2. Séquence d'entrée de la particule lipovirale du VHC.....p.11
- Figure 3. Traduction du génome viral en polyprotéine et enchâssement du protéome au réticulum endoplasmique.....p.12
- Figure 4. Répartition géographique et phylogénétique des différents génotypes du VHC.....p.13
- Figure 5. Cristal du domaine core de la glycoprotéine d'enveloppe E2.....p.17
- Figure 6. Représentation schématique du chemin direct expliquant une substitution nucléotidique en comparaison avec l'existence d'un intermédiaire ancestral.....p.18
- Figure 7. Interprétation schématique du goulot d'étranglement génétique lors de la transmission du VHC suivi par une radiation génétique chez le nouvel hôte.....p.20

Chapitre 2

Article

- Figure 1. Longitudinal analysis of HCV quasispecies diversity in 5 cases of mother-to-child transmission.....p.48
- Figure 2. Phylogenetic analysis of a second bottleneck detected post mother to child transmission.....p.50
- Figure 3. Early childhood viral loads and Shannon's diversity index.....p.51
- Supplemental 2 : Neighbor joining phylogenetic network based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene.....p.54

Supplemental 3 : Neighbor joining phylogenetic network based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene.....p.55

Supplemental 5 : Longitudinal analysis of HCV quasispecies diversity in 5 cases of mother-to-child transmission.....p.57

Chapitre 3

Discussion

Figure 8 : Représentation schématique des régions hypervariables 1 à 2.....p.64

Figure 9 : Schéma expérimental de production de pseudoparticules virales.....p.65

Liste des annexes

Annexe 1 : CD-ROM.....p.78

Programme 1 : Seq_pattern.py

Programme 2 : Frequency.py

Programme 3 : RDF.py

Programme 4 : Frequency_Seq_multiplier.py

Annexe 2 : Schémas expérimentaux *in vitro* et *in silico*.....p.79

Liste des abréviations

5'-NTR	région non traduite 5'
Ac	anticorps
ADAR	adénosines désaminases agissant sur l'ARN
ADCC	cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante
Ag	antigène
ALT	alanine aminotransférase
ARN	acide ribonucléique
AST	aspartate aminotransférase
CD81	tétraspanine CD81
CMV	cytomégalovirus
DAA	agent antiviral à action directe
Fc	fraction cristallisable des immunoglobulines
FcRIIIa	récepteur de la fraction cristallisable des immunoglobulines de type IgG
FcRn	récepteur de la fraction cristallisable des immunoglobulines de type néonatal
HSPG	protéoglycanes héparane sulfate
HVR1	région hypervariable 1
HVR2	région hypervariable 2
HVR3	région hypervariable 3
Ig	immunoglobuline
IgG	immunoglobuline G
IgM	immunoglobuline M
LDLR	récepteur de lipides de faible densité
NCR	région non-codante
PBMC	cellules mononuclées du sang périphérique
Peg-IFN- α	interféron alpha pégylé
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise

SR-B1 récepteur scavenger B1
SVR réponse antivirale soutenue
TME transmission mère-enfant
UDI utilisateurs de drogues injectables
VHB virus de l'hépatite B
VHC virus de l'hépatite C
VIH-1 virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Remerciements

Ayant commencé ma recherche en 2012, moment fort du Printemps Érable québécois, il m'est impossible d'omettre ce moment charnière de l'Éducation québécoise. Le vent a soufflé sur la politique québécoise et un pragmatisme nouveau est né. Ce que je dois à ceux qui ont supporté l'accessibilité à une Éducation exempte de filtre socio-économique, est incommensurable. Sans ceux-ci, **jamais** je n'aurais pu espérer ne serait-ce que l'ombre d'un diplôme d'études supérieures.

J'ai eu le privilège d'être dirigé par le Dr Hugo Soudeyns à qui de je dois beaucoup, tant pour la qualité de son apport scientifique que personnel à mon parcours universitaire. Je le remercie pour son humanisme remarquable et son dévouement inconditionnel qui ont jalonné mon parcours académique ces dernières années.

J'aimerais remercier sincèrement les membres de l'équipe du laboratoire pour leur implication, leur contribution à ma recherche ainsi que leurs conseils avisés. Je ne pourrais manquer de mentionner Martine Caty, notre assistante de recherche, Sylvie Valois, notre infirmière de recherche, Armelle Le Campion et Ariane Larouche qui représentent le cœur de notre équipe d'investigation sur l'infection au virus de l'hépatite C durant la grossesse et chez le jeune enfant.

De façon plus générale, je dois beaucoup à la communauté de la Faculté de médecine et celle du centre de recherche du CHU Sainte-Justine. D'une part la qualité de l'enseignement qui y est dispensé m'a permis de mener à bien les travaux actuels. De plus, je ne pourrais négliger d'évoquer leur soutien administratif et financier continus, indispensables à l'achèvement serein de cette étape de mes études aux cycles supérieurs.

Finalement, j'aimerais profiter de cette tribune pour témoigner de la reconnaissance que je porte à ma tendre partenaire, Pauline Berthélémy. Sa présence durant les moments plus ardues, sa persévérance durant les aller-retours continus entre la France et le Québec ainsi que sa patience ont été essentielles à l'achèvement de ce travail académique.

1. Introduction

1.1 Épidémiologie

On estime qu'à l'échelle mondiale, plus de 160 millions d'individus sont chroniquement infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) (1). Ce nombre est possiblement sous-estimé en raison de la nature irrégulière des échantillonnages. En effet, la plupart des études ne concernent qu'une strate de la population : population urbaine, utilisateurs de drogues injectables (UDI), femmes enceintes, donneurs de sang rémunérés, etc. (2, 3). Conséquemment, de nombreux pays n'ont qu'une vue parcellaire de la situation et l'évaluation de la prévalence tend à en souffrir. Il n'en demeure pas moins que cette dernière tend à s'accroître dans les pays en voie de développement. Des pays comme le Burundi, le Cameroun, l'Égypte, le Gabon et la Mongolie présentent des prévalences pour le VHC oscillant autour de 10% (1, 4).

Bien que l'endémie soit de moindre ampleur en Amérique du Nord (prévalence \approx 1%), on estime que ce sont tout de même 240 000 individus qui sont infectés par le VHC au Canada (5). Qui plus est, de récentes études épidémiologiques révèlent que de nombreux individus contaminés (20-60% des cas) seraient inconscients de leur état (5-7).

1.2 Facteurs de risque

Le VHC se transmet lors du contact avec des fluides biologiques contaminés (8). De nos jours, il se propage essentiellement entre UDI partageant le matériel d'injection (9-11). En effet, depuis 1992, date à laquelle de nombreux pays développés ont instauré le criblage systématique des produits sanguins pour la présence du VHC, la transmission iatrogène a pratiquement été éradiquée (12). Néanmoins, dans les pays où la sûreté des produits sanguins n'est pas assurée, la contraction iatrogène du VHC est toujours d'actualité. La réutilisation de matériel médical contaminé, les interventions faites hors du cadre hospitalier ainsi que le manque de ressources de criblage engendrent toujours un apport important de cas incidents (2, 13-15). Avant 1992, la greffe d'organe et la transfusion comptaient pour une très grande partie des infections au VHC (16). L'acquisition du VHC par contact sexuel chez les hétérosexuels ou professionnels est quant à elle marginale (13, 17, 18). La transmission lors de pratiques sexuelles traumatiques impliquant un contact avec le sang est toutefois plus fréquente. Le

sexe anal, la pénétration anale manuelle passive à répétition sans gants (*fisting*), le sexe en groupe, et l'inflammation ou lésion de la muqueuse anale, notamment retrouvées lors d'infections sexuellement transmises, font partie des risques les plus importants de contraction du VHC par voie sexuelle (19).

1.3 Histoire naturelle

1.3.1 Pathogénèse chez l'adulte

La progression de l'infection au VHC est de nature lente. En effet, de 20-30 ans peuvent s'écouler entre l'établissement de l'infection et l'apparition de symptômes (20). La phase aiguë de l'infection, qui prend place dans les premiers 6 mois suivant l'exposition au VHC, est la plupart du temps asymptomatique. Les symptômes apparaissent dans 15-30% des cas mais ils sont plutôt modérés et de nature non spécifiques (fatigue, myalgie, etc.). Néanmoins, durant la phase aiguë de l'infection, on assiste à une séroconversion et à l'apparition de marqueurs sériques d'inflammation du foie, *i.e.* alanine et aspartate aminotransférases (ALT et AST). Succinctement, La phase aiguë de l'infection au VHC est associée avec une expansion du réservoir viral suivie de l'apparition de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ainsi que de la réponse humorale (21). Dans seulement 25% des cas, la réponse immunitaire est en mesure de résoudre l'infection. La plus grande partie des cas incidents progresseront donc à la phase chronique de l'infection. Comme mentionné précédemment, plus de 20-30 ans peuvent s'écouler avant l'apparition de conséquences physiologiques sévères subséquentes à l'infection. Toutefois, ce sont tout de même de 4-24% des patients pour qui l'infection chronique au VHC se traduira en cirrhose du foie et 1-3% subiront un carcinome hépatocellulaire. En conséquence et considérant le très grand nombre de personnes infectées, l'infection au VHC est la première cause de transplantation hépatique dans de nombreux pays développés dont le Canada (21). En résumé, sur 100 patients étant exposés au VHC, 75 développeront une infection chronique, 3-18 une cirrhose du foie et environ 1 un carcinome hépatocellulaire. Le sexe masculin, un plus vieil âge à l'acquisition du VHC, l'obésité, l'abus d'alcool, la coinfection avec le virus de l'hépatite B (VHB) ou au virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) sont tous des facteurs accélérant la progression de l'infection vers la cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (2).

1.3.2 Transmission mère-enfant

Le VHC se transmet également de la mère à l'enfant et ce, dans 5-10% des cas (22, 23). La transmission mère-enfant (TME) du VHC représente d'ailleurs la première voie d'infection chez les enfants des pays développés (24). Néanmoins, la cause et le cadre temporel de celle-ci demeurent incompris. La TME du VHC est relativement peu fréquente. À titre comparatif, le VIH-1, un virus pourtant réputé moins efficace pour contaminer son hôte lors d'une contamination percutanée, se transmet de la mère à l'enfant dans 25-48% des cas en absence d'intervention préventive (25, 26).

1.3.3 Pathogénèse chez l'enfant

De nombreux auteurs se sont intéressés à l'histoire naturelle de l'hépatite C chez l'enfant. À tort ou à raison, l'infection pédiatrique est fréquemment considérée comme indolente. Il n'en demeure pas moins que similairement à ce qui est observé chez l'adulte, l'infection deviendra la plupart du temps chronique (24). Bien qu'il ne semble pas tout à fait évident que la progression pédiatrique de l'infection soit réellement atonique, l'issue de celle-ci est généralement caractérisée selon trois catégories types (27). 1) Environ 20% des enfants infectés par TME semblent résoudre l'infection de façon spontanée. 2) 20% transiteront à la phase chronique de l'infection qui sera typiquement peu symptomatique et caractérisée par une virémie parfois intermittente. 3) Les 60% restants subiront une infection chronique caractérisée par une réplication active, une virémie persistante et une inflammation hépatique accrue. À l'instar de ce qui est observé chez l'adulte, l'hépatite C pédiatrique mène ultimement à une cirrhose du foie pouvant se détériorer en un carcinome hépatocellulaire ou une défaillance terminale de l'organe (20, 28-32). La compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents à la TME du VHC représente donc un intérêt incontestable dans le domaine de la santé materno-infantile. À cet effet, **le présent manuscrit s'intéresse à la caractérisation de la TME du VHC en abordant l'angle de la phylogénétique virale.**

1.3.4 Immunité anti-VHC de l'enfant

Les aspartate et alanine amino transférases (respectivement AST et ALT) sont des enzymes normalement intracellulaires dont le dosage sérique sert à jauger la sévérité des dommages hépatiques. Ces marqueurs d'inflammation sont souvent élevés à la naissance et lors des 2-3 premières années chez les enfants verticalement infectés par le VHC (33, 34). Le VHC n'étant pas cytopathique, ceci témoigne possiblement de l'existence d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique du VHC chez le jeune enfant (35). En effet, dans le contexte de l'hépatite C, les dommages hépatiques sont principalement le fait de lymphocytes cytotoxiques. Bien que transitoirement et de façon insuffisante, ceux-ci répondent à l'infection du tissu hépatique en éliminant les cellules infectées par cytotoxicité (36, 37). Il semblerait donc que le fœtus soit en mesure de monter une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique du VHC. Étant donné le caractère invasif de la biopsie, ce type de réponse n'a encore jamais été détecté mais la capacité du fœtus à monter une réponse cytotoxique robuste contre d'autres pathogènes est bien décrite (38). Plus tardivement, le jeune enfant génère des immunoglobulines (Ig) spécifiques au VHC mais celles-ci ne sont détectables que suite à la disparition des Ig de type G (IgG) maternelles passivement acquises (nous y reviendrons). Généralement, la production d'immunoglobulines infantiles spécifique du VHC survient vers 9 mois de vie (39, 40).

1.4 Hypothèses du passage du VHC à l'interface maternofoetale

La littérature concernant les causes de la TME du VHC est encore fragmentaire. À ce jour, nous savons que le VHC se transmet *in utero* et de façon périnatale (23). En effet, la détection de l'ARN viral à la naissance est considérée comme un indice de transmission durant la gestation (41). *A contrario*, l'apparition d'une virémie tardive témoigne, quant à elle, soit d'une contamination intrautérine retardée ou encore d'une transmission *peripartum* (42, 43). Considérant que la césarienne ne semble pas prévenir la TME et que le virus ne s'accumule pas au niveau du liquide amniotique, il s'avèrerait qu'il soit apte à franchir l'interface maternofoetale du placenta (24, 44, 45). Cependant, la mécanistique biologique sous-jacente à ce passage reste à clarifier.

Le placenta est une structure dont l'organisation est chimérique entre la mère et l'enfant et qui sert d'interface d'échange. Sa structure de base est le villi, une structure fœtale qui envahit la décidua

utérine et permet une maximisation du contact avec le sang maternel (Figure 1) (46). Lors du trafic sélectif de substances entre le compartiment maternel et infantile, les trophoblastes, cellules constitutives du placenta, opèrent une transcytose polarisée (47). Autrement, ces cellules forment un syncytium étanche au compartiment sanguin maternel (48).

À l'interface du tissu placentaire, il existe un microenvironnement immunologique unique. En effet, non seulement est-ce qu'il y réside une agrégation importante de cellules immunitaires mais un gradient de fréquence relative de cellules lymphocytaires NKT et T $\gamma\delta$ est observé entre la décidua utérine et le placenta (49, 50). Il est admis que la qualité de la réponse des cellules NK et NKT joue un rôle important dans la résolution de l'infection par le VHC (51, 52). Ces cellules pourraient donc effectuer une pression immunitaire déterminante dans la TME du VHC. Notons, que ces dernières sont capables de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) via l'attachement de la fraction constante d'un anticorps (Fc) à leur récepteur FcR3a (CD16) (53). Suite à un signal anormal suffisant pour leur activation, les lymphocytes NK et les T $\gamma\delta$ sont en mesure de provoquer la maturation des cellules dendritiques via la signalisation cytokinique (54).

Sachant que le cytomégalovirus (CMV), VHB et le VIH-1 sont en mesure d'exploiter le trophoblaste comme véhicule de transport, il est concevable que le passage du VHC soit ainsi favorisé (55-57). En effet, la susceptibilité des trophoblastes au VHC a récemment été démontrée *in vitro* (58). Bien que la capacité répliquative du VHC dans ces cellules soit à débattre, ceci atteste, à tout le moins, de la capacité du virus à passer la barrière trophoblastique. De surcroît, l'ensemble des récepteurs participant à l'infection par le VHC (CD81, LDL-R, SR-B1, claudine et occludine) sont exprimés à l'interface maternofoetale du placenta (59-61).

Le trophoblaste se spécialise également dans le transport transplacentaire des IgG. Il est plausible que le VHC traverse la barrière trophoblastique, à l'instar du CMV, en association à celles-ci (56). D'une part, ce n'est qu'après l'acidification de l'endosome que les IgG s'associent fermement au récepteur néonatal d'immunoglobulines (FcRn) (62). D'autre part, il semblerait que la TME du VHC soit liée à la présence sérique d'Ig de type M (IgM) spécifiques du VHC (63). Typiquement, une réponse immunitaire humorale se déroule d'abord par une phase de production d'IgM par les plasmocytes qui, suite à un réarrangement génétique appelé commutation isotypique, produiront des IgG de même spécificité.

Finalement, et bien que cette hypothèse demeure controversée, quelques manuscrits font état de la relation entre l'infection des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) par le VHC et sa TME

(64-66). Comme en témoigne le microchimérisme génétique observé au niveau des ganglions lymphatiques fœtaux, les PBMC circulent de la mère à l'enfant (67). Il est donc vraisemblable que des PBMC VHC+ soient transférés d'un espace sanguin à l'autre. Il est possible également que le passage mère-enfant du virus soit favorisé en cas de microlésions placentaires. Notons que l'inflammation au placenta est un facteur de risque de la TME du VIH-1 (68-70).

Si l'on considère le nombre colossal de particules virales qui ont accès au lit placentaire durant la grossesse (évalué à 10^{14}), le faible taux de TME du VHC apparaît donc énigmatique (71). La validation de l'ensemble des hypothèses abordées ici demeure donc à compléter. Notons qu'il n'est pas invraisemblable que plusieurs temps et mode d'infection puissent être concomitants lors de la TME du VHC. Nous savons cependant que la TME du VHC n'a à toute fin pratique jamais lieu lorsque la virémie du plasma est $<1 \cdot 10^5$ particules virales/ml, renforçant l'idée qu'elle est inefficace (23).

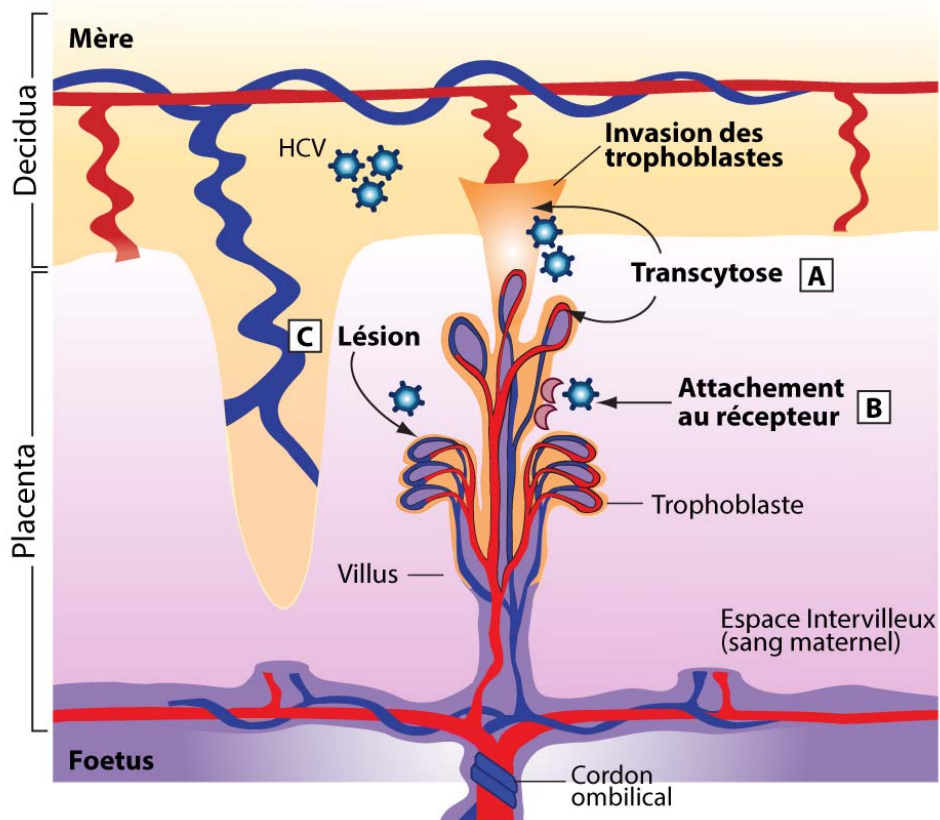


Figure 1 : Représentation schématique d'un villi placentaire et des possibles modes de transmission du VHC à l'interface materno-fœtale. A : Passage du VHC par transcytose, associé ou non à des immunoglobulines; B : Infection des trophoblastes par attachement spécifique aux récepteurs; C : passage au site d'une microlésion. Adapté de (23).

1.5 Coinfection avec le VIH-1

Puisqu'il se transmet également lors de contact avec les fluides biologiques contaminés, le VIH-1 occupe la même niche épidémiologique que le VHC. Le taux de coinfection avec le VHC chez les personnes séropositives pour le VIH-1 oscille à près de 20% au Canada (72). Le VIH-1 a un tropisme cellulaire typiquement orienté vers les cellules exprimant le récepteur CD4 soit, les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques (73). Les cellules CD4+ sont le pivot de la coordination de l'immunité à médiation cellulaire. Conséquemment, l'infection se traduit en une chute graduelle du décompte de ces lymphocytes et mène au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Comme mentionné précédemment, la TME du VHC est un événement peu fréquent. Toutefois, la coinfection de la mère avec le VIH-1 accroît substantiellement l'incidence de celle-ci. En effet, le risque de TME du VHC est de 3-4 fois plus important en cas de coinfection maternelle avec le VIH-1 (23, 74, 75).

Le VIH-1, en absence d'intervention préventive, se transmet également de la mère à l'enfant. Or, il semblerait que la transmission de ces deux virus soit indépendante (74). Ceci suggère que des mécanismes différents régissent le passage materno-infantile du virus. Il semble néanmoins cohérent de suggérer que l'immunodépression subséquente à l'infection par le VIH-1 soit responsable de l'augmentation observée du taux de TME du VHC. Ce raisonnement s'appuie principalement sur le fait qu'on observe généralement une augmentation de la charge virale du VHC en cas de coinfection (72, 76). Cela dans un contexte où la TME du VHC semble être particulièrement influencée par l'importance de la charge virale (23).

1.6 Pharmacopée contemporaine

Il n'existe aucun vaccin contre le VHC. Jusqu'à tout récemment, l'essentiel de la pharmacopée anti-VHC se résumait à l'interféron alpha pégylé (Peg-IFN- α) combiné à un analogue nucléosidique, la ribavirine (77). Ce traitement suscite une réponse antivirale soutenue (SVR) chez 50-80% des patients (78). Cependant, la tolérabilité de ce traitement est suboptimale. En effet, l'administration du Peg-IFN- α est responsable d'effets secondaires sévères tel que des symptômes grippaux, l'auto-immunité et la dépression (79, 80). De plus, en raison de sa nature protéique, c'est un médicament obligatoirement injectable.

La progression de la compréhension du cycle répliatif du VHC a mené à l'arrivée d'agents antiviraux à action directe (DAA). Il est désormais possible de susciter une résolution de l'infection dans >90% des cas pour l'ensemble des génotypes en ciblant directement les protéines virales (78, 81). Le télaprévir et le bocéprévir, des inhibiteurs de protéase virale (NS3/4A), sont apparus au Canada à l'automne 2011 (82, 83). Le sofosbuvir, quant à lui, est un inhibiteur de polymérase (NS5B) disponible depuis début 2014 (84). Ils sont tous donnés en combinaison avec le Peg-IFN- α et la ribavirine. Néanmoins, des essais cliniques prometteurs de phase II-III sont en cours afin de jauger la possibilité d'administrer des DAA alternatifs à l'interféron en combinaison avec le sofosbuvir, la ribavirine ou d'autres molécules en essai clinique (78, 85). Parmi les molécules candidates à un traitement sans IFN- α , on retrouve plusieurs

inhibiteurs de protéase et de polymérase. Les résultats préliminaires d'études cliniques de phase III confirment l'efficacité des nouvelles molécules administrées sans IFN- α . En effet l'ABT-450 (inhibiteur de protéase administré avec le ritonavir (potentialisateur de la disponibilité sérique de l'ABT-450), l'ombitasvir (inhibiteur de réplication virale via NS5A) administré avec dasabuvir (inhibiteur de polymérase) et le ledipasvir (inhibiteur de NS5A) administré avec le sofosbuvir mènent à la résolution de l'infection dans >90% des cas. En raison d'une barrière génétique à la résistance plutôt faible, il semble vraisemblable que l'ensemble de ces nouvelles molécules, à l'exception du sofosbuvir, devront être administrées en trithérapie (86). L'état actuel des connaissances pave la voie à de nombreux traitements offrant un contrôle accru de l'infection et une toxicité/morbidité moindres. Toutefois, en date de la rédaction du présent manuscrit, le traitement au sofosbuvir coûtait >80k\$ (81). Qui plus est, l'ensemble des thérapies proposées sont contraindiquées durant la grossesse (82-84, 87). La disponibilité incertaine des médicaments de nouvelle génération dans les pays en voie de développement - où réside l'essentiel du réservoir mondial du VHC - ainsi que l'absence d'intervention préventive quant à la TME du VHC appellent à la persévérance des efforts pour la compréhension des mécanismes de transmission.

1.7 Virologie

1.7.1 Origine du VHC

Jusqu'à tout récemment, le VHC était considéré comme le seul virus du genre *hepaciviridae* (88). Néanmoins, la découverte récente d'homologues canin, équin et murin ayant chacun 50-60% de divergence avec le VHC a transformé ce dogme (89-91). Ainsi, il semble possible que l'acquisition du VHC chez l'humain soit issue d'une infection zoonotique via des animaux domestiques mais, la découverte de nouveaux *hepaciviridae* infectant les non-primates étant récente, il convient de pondérer ces propos. Dernièrement, il a été mis en lumière que la chauve-souris, un réservoir notoire des virus mammaliens, est l'hôte en santé de plusieurs virus phylogénétiquement reliés aux *hepaciviridae* (92). Il existerait donc vraisemblablement d'autres hôtes mammaliens à identifier afin de clarifier l'histoire de l'acquisition du VHC chez l'homme. Notons que la présentation clinique de ces virus peut être bien différente de chez l'humain, comme c'est le cas chez le chien (syndrome respiratoire).

Bien que la phylogénie du VHC soit encore peu documentée et qu'un travail colossal d'identification d'homologues animaux des *hepaciviridae* soit à compléter, la propagation à large échelle, récente chez l'espèce humaine, est bien décrite. Elle est principalement associée à la modernisation des techniques médicales ainsi qu'à la popularité des drogues injectables (13). Comme mentionné plus haut, l'utilisation non-sécuritaire de matériel d'injection, les transfusions et la greffe d'organe a largement contribué à la propagation du VHC. En Égypte une campagne nationale contre le schistosome, un parasite, a mené à l'injection d'émétique à des millions d'égyptiens (93). Au mieux, les seringues étaient « stérilisées » par ébullition de 1-2 minutes et souvent une seule aiguille était utilisée par famille. Les médecins pouvaient performer, dans ces conditions, jusqu'à 500 injections à l'heure, ce qui a inéluctablement mené à l'endémie qu'on connaît aujourd'hui (93). Dans la plupart des pays, les transfusions sanguines ont occupé un rôle central dans la propagation du virus (65)

1.7.2 Généralités

Le VHC est l'unique représentant du genre *hepaciviridae* infectant les humains. Il fait partie de la famille des flaviviridae (94). C'est un virus enveloppé comportant un seul brin d'ARN de polarité positive et la structure secondaire de son génome est hautement organisée (95, 96). Il comprend ~9600 paires de bases, pour un total d'environ 3000 acides aminés. Le cadre de lecture est donc considérablement dense, d'autant plus qu'il est flanqué de régions non-codantes (NCR) qui sont indispensables à la régulation tant de sa réplication que de sa traduction (97, 98). Le VHC circule dans le sang périphérique associé à des lipoprotéines et possède un tropisme essentiellement hépatique (99, 100).

1.7.3 Cycle de réplication

Le VHC se réplique efficacement au niveau des hépatocytes lesquels il infecte via plusieurs récepteurs essentiels à son entrée : CD81, SR-B1, LDL-R, claudine et occludine (101, 102). Il semblerait que l'entrée clathrine-dépendante du VHC soit séquentiellement initiée par l'attachement de la particule lipovirale aux protéoglycanes héparane sulfate (HSPG) et au récepteur de lipides de faible densité (LDL-R). SR-B1, une tétraspanine, séparerait ultérieurement le virion de la structure lipoprotéique et permettrait l'exposition du site d'attachement à CD81 situé en N-terminal de la glycoprotéine d'enveloppe E2. Claudine et occludine, des protéines de jonction serrée, ont des rôles essentiels à l'entrée mais indirects (Figure 2) (revu ici, (101, 103, 104)).

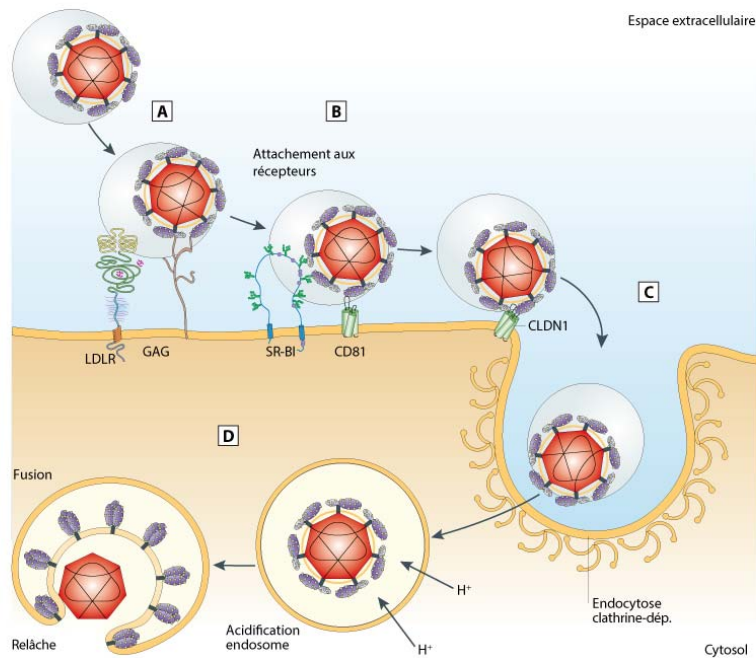


Figure 2 : Séquence d'entrée de la particule lipovirale du VHC. A : attachement de la particule lipovirale aux HPSG et au récepteur de lipides de faible densité; B : interaction de la particule lipovirale avec SR-B1 via E2 et exposition du site d'attachement de la glycoprotéine E2 à CD81; C : Entrée clathrine dépendante de la particule virale ; D : Acidification de l'endosome suivie de la fusion membranaire et relâche de la capsid virale au cytosol. Adapté de (104).

Suite à l'entrée, l'acidification de l'endosome et la fusion membranaire, le virion est décapsidé, ce qui permet la relâche du génome au cytosol (105, 106). Grâce à un site d'entrée ribosomal (IRES) localisé au 5'-NTR, le génome de polarité positive est immédiatement pris en charge par la machinerie traductionnelle cellulaire au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (107). Le génome est intégralement traduit en une polyprotéine qui est ensuite clivée par les protéases cellulaires et virales, libérant de ce fait les différentes protéines structurales (Core, E1 et E2) des non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a et NS5b) (Figure 3, A) (108). Ultiment l'ensemble des protéines structurales seront enchâssées à la membrane rugueuse du réticulum endoplasmique (Figure 3, B) (109). La complétion de cette phase précoce permet la réplication de l'ARN positif en ARN négatif par la

polymérase virale (NS5B). Ce dernier brin servira ensuite d'étampe génétique (110). Les polymérase ARN ne disposant pas de mécanisme de correction, ces deux étapes de réplication sont extrêmement mutagènes. Dans les faits, on estime à 10^{-4} substitutions nucléotidiques par cycle le taux net d'erreurs induites par la réplication (111). En conséquence, on retrouve le VHC à l'échelle mondiale en 7 génotypes différents qui ont moyennement entre eux de 60-70% d'homologie (Figure 4, A) (112). Ces derniers sont souvent confinés à certaines zones géographiques (Figure 4, B) (1).

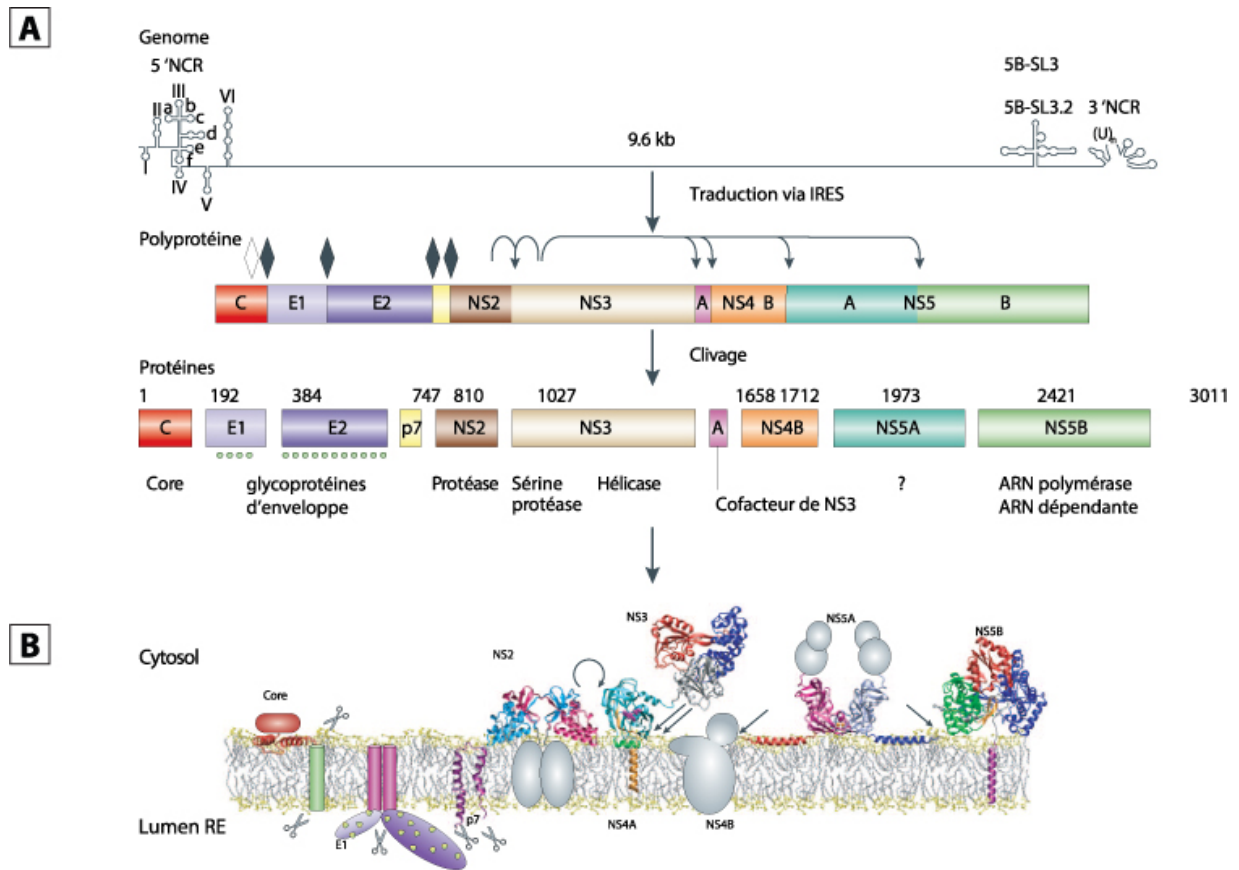


Figure 3 : Traduction du génome viral en polyprotéine et enchâssement du protéome au réticulum endoplasmique. A : Traduction du génome viral en une polyprotéine, B : Enchâssement du protéome viral post clivage. Losange blanc : site d'autoclivage. Losange noir : sites de clivage par les protéases cellulaires. Adapté de (104).

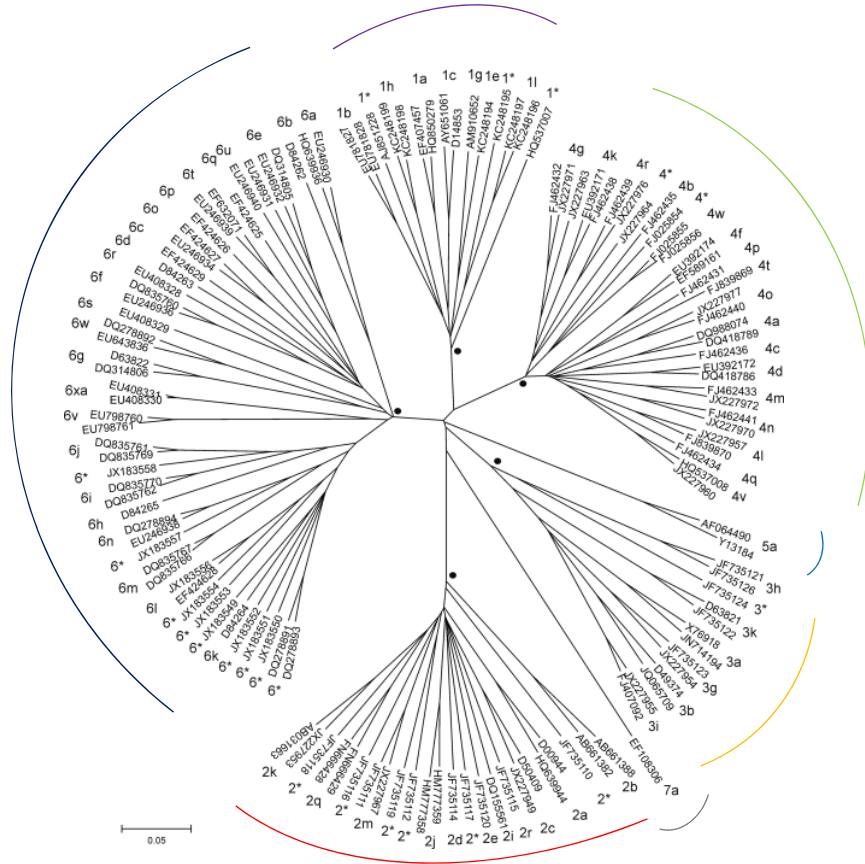
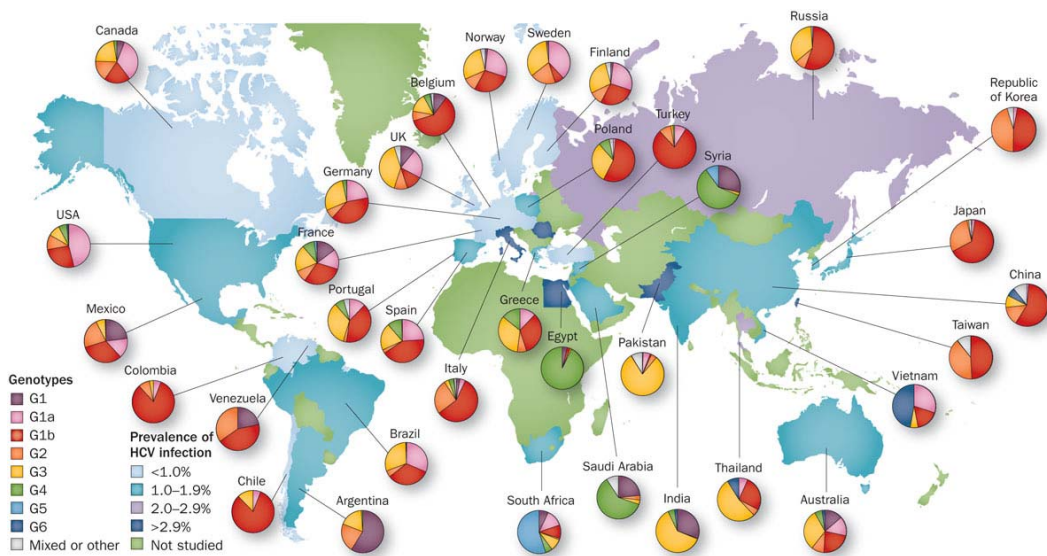
A**B**

Figure 4 : Répartition géographique et phylogénétique des différents génotypes du VHC. A : Répartition phylogénétique, échelle en divergence génétique relative ; **B :** Répartition géographique. Adapté de (21) et (112).

1.8 Quasispéciation

La théorie de la quasispéciation (ce terme a été adopté plus tard) des molécules auto-répliquatives a été introduite par Eigen en 1971 (113). La pérennité d'une espèce, en termes darwiniens, se résume à la survie et perpétuation du plus apte. En se répliquant, les virus ARN, commettent un assortiment d'erreurs menant à l'émergence de variantes plus ou moins aptes à se multiplier mais aussi plus ou moins immunogènes (114). Ainsi, même si lors de sa réplication mutagène, un virus atrophie la capacité répliquative de sa descendance, il permet « l'exploration » d'un vaste espace de séquences possibles (114, 115). Une flexibilité accrue existe donc lors d'un changement subit de pression de sélection : nouvel hôte, changement de thérapie, immunosuppression, etc. (extensivement décrit ici : (116)). On appelle robustesse la capacité d'un virus à se propager invariablement aux changements génétiques et environnementaux (117). Celle-ci est en lien avec un ensemble de facteurs, dont l'échappement de la réponse immunitaire et la conservation de l'infectivité (114). La robustesse représente donc la somme des tolérances aux changements. La plasticité du virus étant au cœur du concept, une variante majoritaire chez un hôte n'est pas nécessairement celle ayant une capacité répliquative maximale mais plutôt, celle qui arrive à persister malgré l'ensemble des agressions.

1.8.1 Quasispéciation des virus pathogènes humains

Plusieurs virus infectant l'Homme sont des virus ARN. Leur contrôle représente un défi particulier puisque la quasispéciation découlant de leur réplication mutagène mène à l'échappement de la réponse immunitaire. C'est le cas du VIH-1, du virus Influenza, du VHC, du virus Ebola, de HTLV (*human T cell lymphotropic virus*), de coronavirus et de nombreux arbovirus (114). La diversification de ces virus est extrêmement dynamique et la persistance de variantes tient compte, comme mentionné précédemment, de la robustesse, de la capacité répliquative et de l'échappement de la réponse immunitaire (116, 117). Un exemple éloquent de ce contexte évolutif et immunologique est la présence de variantes archivées du VIH-1 dans les sanctuaires immunologiques. En effet, des variantes ancestrales sont préservées aux tissus immunologiquement réprimés comme les testicules, le système nerveux central, etc. Là où il existe une certaine entrave à l'expression de la pleine ampleur de la réponse immunitaire en raison d'un contact restreint avec le compartiment sanguin, l'évolution de la quasispèce virale semble soit statique ou du moins indépendante du site d'infection principal (118,

119). La contrainte évolutive peut également être directe. C'est ce qui est observé dans le cas de facteurs de restriction comme les adénosines désaminases agissant sur l'ARN (ADAR) (120). ADAR-1 est une désaminase dont l'expression est induite par l'IFN. Celle-ci agit sur les ARN double brin tels que ceux qu'on peut retrouver lors de la réplication du VHC et possiblement au niveau des structures secondaires du génome de ce dernier. Les ADARs mutent l'adénosine en inosine et participent donc directement à la génération de diversité si la modification est portée sur un brin d'ARN de polarité positive voué à l'encapsidation ou encore sur un brin de polarité négatif servant d'étampe génétique (121). Notons que l'inosine est lue comme une guanosine lors de la traduction par les ribosomes et une telle altération peut participer à l'échappement de la réponse immunitaire. Dans son ensemble, le phénomène de variabilité génétique accrue des virus ARN rend donc extrêmement difficile de générer une réponse immunitaire à large spectre contre certains de ces virus. Conséquemment, la production de vaccins pour certains virus ARN est encore laborieuse (116).

1.8.2 Quasispéciation du VHC

On estime que plus de 10^{12} particules virales du VHC sont générées chaque jour chez une personne infectée (122). En concomitance avec un taux de substitution nucléotidique considérable (voir plus haut), le VHC se retrouve donc chez son hôte sous la forme d'une famille de virions différents mais génétiquement apparentés que l'on nomme quasiespèce (123). Ce phénomène est responsable, du moins en partie, de l'échec du système immunitaire à résoudre l'infection. C'est l'une des raisons inhérentes de la persistance du VHC (124).

1.8.3 Hypervariabilité

Une grande partie de la variabilité génétique du VHC se concentre en N-terminal de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (position 384-482 en acides aminés du génome de référence M62321) (125, 126). Les 81 premiers nucléotides (positions nucléotidique 1491-1571) sont désignés région hypervariable 1 (HVR1). C'est la région la plus variable du génome. En aval, des nucléotides 1761-1787, on retrouve une seconde région d'hypervariabilité nommée HVR2. HVR1 et HVR2 flanquent une région de variabilité intermédiaire mise à jour par notre équipe et que nous nommons HVR3 (Figure 5) (127).

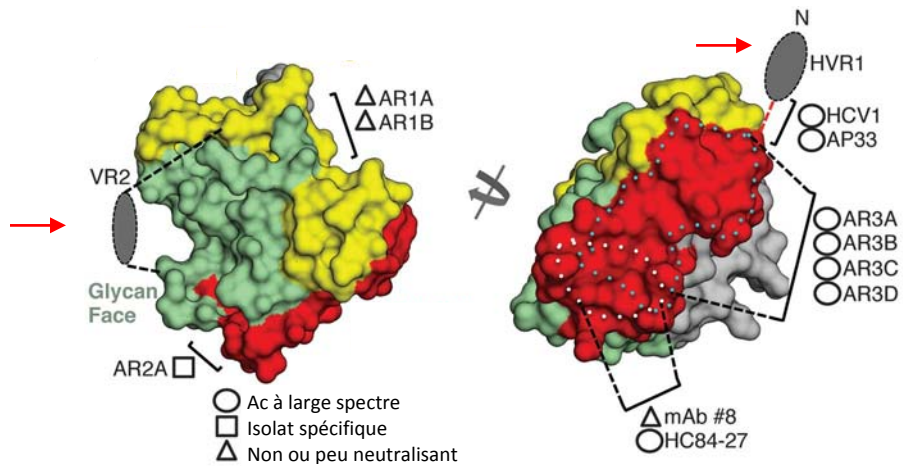


Figure 5 : Cristal du domaine core de la glycoprotéine d'enveloppe E2. La région VR2 correspond à HVR2. Des épitopes ciblés par des Ac connus sont illustrés. Adapté de (125)

1.9 Phylogénie

La notion de quasispéciation des virus entraîne inéluctablement la question de la parenté des différentes variantes entre-elles. Le lien de parenté entre deux entités est d'ailleurs le sujet d'intérêt de la phylogénie. Ce domaine de la science vise non seulement à déterminer le lien de parenté entre deux entités mais aussi à comprendre la distance évolutive qui les sépare. À cet égard, l'avènement du séquençage de Sanger, dans un premier temps, et du séquençage de nouvelle génération, survenu dernièrement, a entraîné l'explosion de l'information disponible et l'affinement des modèles d'évolution. De façon empirique, la distance génétique est définie comme « le nombre moyen de substitutions par site s'étant produites depuis que ces séquences ont divergé de leur ancêtre commun » (128).

1.9.1 Évolution moléculaire

De façon intuitive, nous pourrions considérer que la distance qui sépare deux variantes virales est le nombre de substitutions nucléotidiques observés divisé par le nombre de sites examinés. Cette approximation est appelée p distance mais ne reflète pas la distance réelle entre deux variantes. En

effet, même si nous observons au temps t une seule substitution nucléotidique entre deux variantes, il est possible que d'autres substitutions intermédiaires soient survenues chez des ancêtres avant le résultat final.

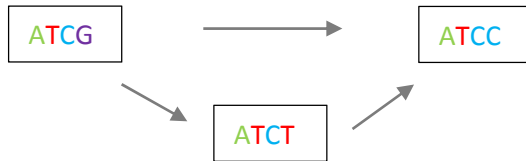


Figure 6 : Représentation schématique du chemin direct expliquant une substitution nucléotidique en comparaison avec l'existence d'un intermédiaire ancestral.

1.9.2 Modélisation de l'évolution moléculaire

Dans l'exemple présenté en Figure 6, entre la variante ATCG et ATCC, il est possible qu'il y ait une distance de 1 ou 2 nucléotides (par 4 sites nucléotidiques). La plupart du temps, il est impossible de connaître avec précision les intermédiaires ancestraux. C'est ici qu'interviennent les modèles évolutifs. Nous ne couvrirons pas ceux-ci en détail, là n'est pas l'objectif du présent manuscrit. Néanmoins, attardons-nous à l'essence de ceux-ci.

Ces modèles algorithmiques introduisent la notion que la distance génétique réelle est possiblement plus grande que celle observée. Ces derniers permettent également d'apposer des taux de substitutions distincts pour les différents nucléotides (adénosine, thymidine, cytosine, guanosine) et pour les différents types de substitution (transition *versus* transversion). Il est donc ainsi possible de tisser avec une meilleure précision le lien de parenté entre les variantes ainsi que de déterminer adéquatement la distance génétique qui les sépare. Typiquement, la représentation graphique de cette information est un arbre phylogénétique comme ceux que nous présenterons. Le tracé de ce type d'arbre tient compte de la vraisemblance d'observer une phylogénie donnée en fonction d'un modèle évolutif donné. C'est un ce qu'on appelle la technique du *maximum likelihood* (129).

À ces outils de calcul de phylogénétique, s'ajoute la notion de diversité. Il est possible de tirer certaines informations de la structure d'une population de variantes en comparant les taux de substitutions nucléotidiques. En effet, il est courant d'évaluer le rapport entre les substitutions synonymes par site synonyme et non synonymes par site non synonyme (dN/dS). Lorsqu'une certaine pression de sélection (ω) est observée, il est reconnu que le nombre de substitutions non-synonymes sera favorisé comparativement aux substitutions synonymes. Un rapport >1 témoignera d'une pression de sélection positive. Inversement, un rapport < 1 témoigne d'une pression de sélection négative (130).

Alternativement, il peut être intéressant de mesurer l'hétérogénéité d'une population virale. Pour ce faire il est possible de calculer l'indice de Shannon qui tient compte de la proportion relative de chaque variante mais également de la distribution entropique de celle-ci. L'indice maximal est atteint lorsqu'il y a de nombreuses variantes dont les fréquences relatives sont également réparties, en harmonie avec la notion d'entropie. Comme cette valeur est fonction du nombre de variantes, il est commun de normaliser l'indice de Shannon en divisant par la valeur maximale possible ($\log R$) pour chaque population étudiée. L'indice de Shannon est calculé : $H' = -\sum_{i=1}^R p_i \ln p_i$

Où H' = l'indice de Shannon, p_i = la fréquence relative d'une variante, et R = le nombre de variantes différentes. La normalisation est comprise entre 0 et 1 (131).

Finalement, il est parfois nécessaire de comparer entre-elles des populations de variantes afin de savoir à quel point elles sont différentes. L'algorithme Morisita-Horn permet de le faire en comparant le nombre de variantes qui sont partagées entre deux populations. Cet algorithme tient compte de la taille de l'échantillonnage et suppose que plus ce dernier est important, plus « d'espèces » seront observées. Notons que ces indices sont issus de l'écologie des populations. L'indice de Morisita-Horn a une valeur de 1 lorsque le chevauchement est parfait et de 0 dans le cas contraire (132).

1.10 Goulot d'étranglement

Jusqu'à maintenant, il est consensuel que la transmission entre adultes implique un nombre limité de particules virales capables d'établir l'infection (133-137). Ce phénomène est appelé goulot d'étranglement génétique. Il semble que le nombre de virions établissant une infection productive soit limité mais puisse tout de même atteindre une trentaine de variantes fondatrices (138). Les causes de ce goulot d'étranglement sont encore mal comprises mais il est vraisemblable qu'il soit la résultante,

dans l'ensemble, d'un changement de la pression de sélection d'un hôte à l'autre (133). **Le goulot d'étranglement lors de la transmission du VHC est la conséquence naturelle de l'infection productive par un nombre limité de particules virales en concomitance avec une importante diversité virale** (Figure 7). Il pourrait être le résultat d'une sélection au point d'entrée, d'une amplification préférentielle de variantes robustes ou encore d'une élimination immunitaire de variantes ayant un profil particulièrement immunogène chez le nouvel hôte (sélection négative).

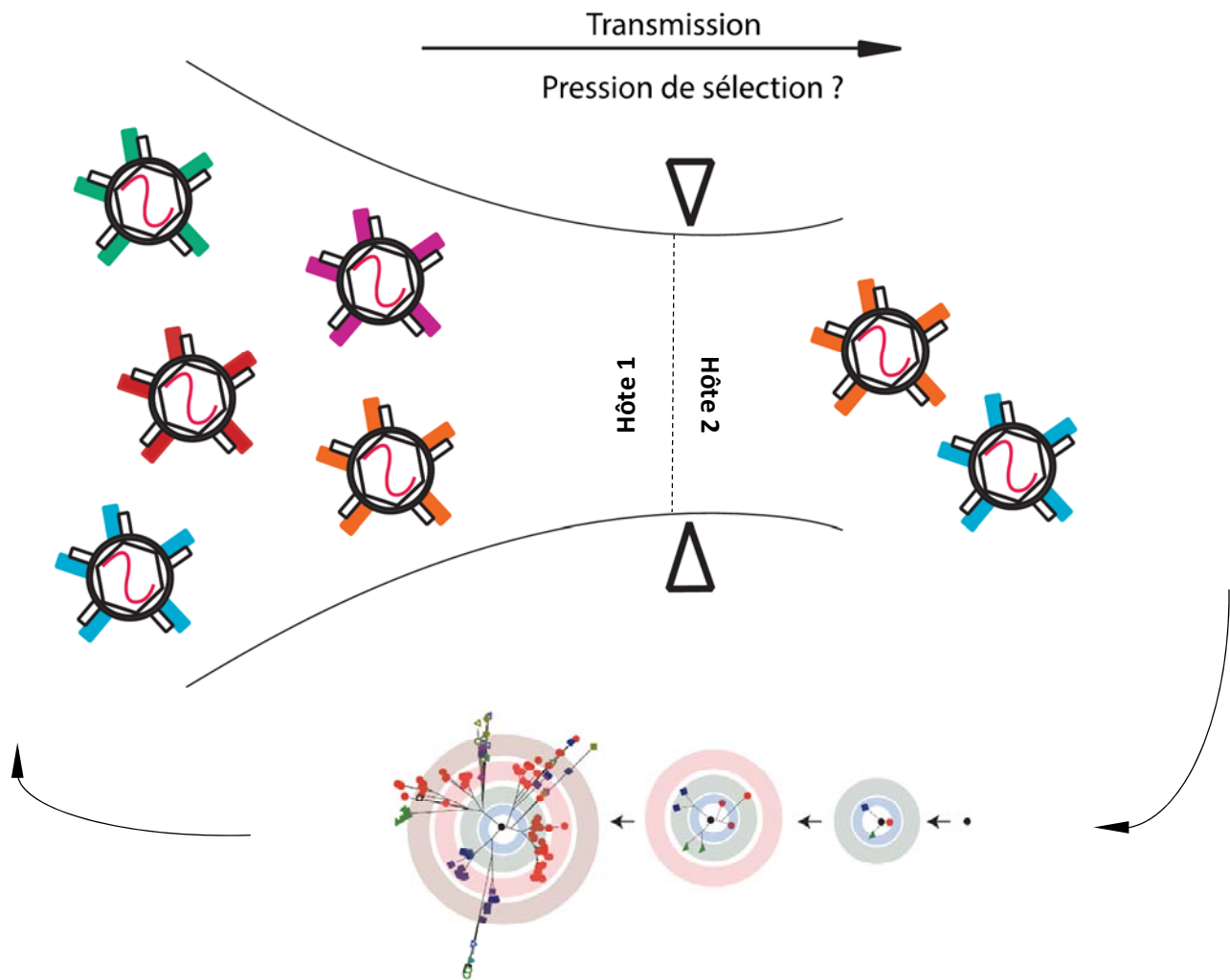


Figure 7 : Interprétation schématique du goulot d'étranglement génétique lors de la transmission du VHC suivi par une radiation génétique chez le nouvel hôte. Adapté de (114).

1.11 Le goulot d'étranglement lors de la transmission mère-enfant du VHC

Les causes de la TME du VHC demeurent sous-documentées. Malgré un rapport récent sur les déterminants de l'immunologie cellulaire impliqués dans deux TME du VHC, aucune étude exhaustive n'a encore caractérisé cette dernière (139). Nous savons que la collection de variantes retrouvées chez l'enfant est génétiquement adjacente et la plupart du temps différente par rapport à celle retrouvée chez la mère (Étude pilote non publiée et (140, 141)). Il semblerait qu'il existe un goulot d'étranglement génétique lors de la TME du VHC mais son existence reste à confirmer et sa caractérisation, à achever.

1.12 Hypothèses et objectif

Notre question de recherche s'articulait autour de l'inefficacité apparente (voir plus haut) de la TME du VHC. **Nous cherchions à savoir précisément quelles sont les variantes qui arrivent à traverser l'interface maternofoetale et quel lien phylogénétique elles entretiennent entre-elles et avec la quasiespèce maternelle.** Nous pensons que cette information pourra clarifier la mécanistique sous-jacente à la TME en étayant, au moins en partie, les différentes dynamiques biologiques pouvant survenir durant celle-ci.

Au moment d'effectuer les expérimentations, la littérature précédente ainsi que notre expérience nous dévoilait la possibilité de l'existence d'un goulot d'étranglement lors de la TME du VHC. L'objectif premier était de confirmer l'existence de ce dernier et de le caractériser en utilisant les technologies contemporaines de séquençage en profondeur. Le pyroséquençage Roche 454 GS FLX+ que nous utilisons permet d'obtenir un nombre imposant de séquences (jusqu'à 1000 bases par séquence et plusieurs centaines de milliers de séquences par ronde de séquençage). Nous avons pu ainsi caractériser le goulot d'étranglement avec une précision sans précédent en se basant sur le séquençage des régions les plus variables du génome, c'est-à-dire les régions hypervariables 1,2 et 3 situées en N-terminal de E2.

Les résultats de cette étude, qui se basent sur une analyse longitudinale, permettront de clarifier les déterminants phylogénétiques de la TME du VHC ainsi que d'identifier les variantes fondatrices chez l'enfant. Non seulement serons nous en mesure d'identifier précisément le moment de transmission

mais ces informations permettront de mieux comprendre la pathogénèse de l'hépatite C chez l'enfant et pourront clarifier le meilleur moment pour mettre en place de nouvelles approches pour contrer l'infection infantile par le VHC.

2. Article

Contribution à l'article

Cet article est en préparation. Il sera éventuellement bonifié par le travail d'autres auteurs.


La plupart des expériences présentées ici ont été effectuées par moi. Ariane Larouche a effectué une grande partie de la mise au point de la technique d'amplification. Jonathan Boulais a rédigé les scripts informatiques. Chanel Béland a aidé au contrôle de la méthodologie du séquençage. Les Drs Marc Boucher, Valérie Lamarre et Normand Lapointe ont été responsables du recrutement. Dr François-Loïc Cosset a fourni le plasmide contrôle phCMV-E1E2. Dr Hugo Soudeyns et moi-même avons rédigé cet article ensemble.

Classification: Biological Sciences, Microbiology.

CHARACTERIZATION OF THE TRANSMISSION BOTTLENECK IN MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION OF HEPATITIS C VIRUS (HCV).

Sébastien Fauteux-Daniel^{a,b}, Ariane Larouche^{a,b}, Jonathan Boulais^c, Chanel Béland^{a,b}, Marc Boucher^{d,e}, Valérie Lamarre^{d,f}, Normand Lapointe^{d,f}, Armelle Le Campion^{a,b}, and Hugo Soudeyns^{a,b,f}.

^aUnité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada; ^bDepartment of Microbiology, Infectiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada; ^cCentre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada; ^dCentre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS), Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, H3T 1C5 Canada; ^eDepartment of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada; ^fDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada.

Corresponding author: Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. 

Key words: Hepatitis C virus (HCV); vertical transmission; pregnancy; bottleneck; human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1); next generation sequencing.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) can be transmitted from mother to child during pregnancy and childbirth. However, the timing and precise biologic mechanisms that are involved in this process are incompletely understood, as are the determinants that influence transmission of particular HCV variants. Here we report results of a longitudinal assessment of HCV quasispecies diversity and composition during the course of pregnancy in 5 HCV-infected women, including 3 who were co-infected with HCV and HIV-1, and their HCV-infected children. The population structure of HCV variant spectra based on E2 envelope gene sequences (nucleotide positions 1491-1787), including hypervariable regions 1 and 2, was characterized using next-generation sequencing and median joining network analysis. Results indicate that in some cases, numerous distinct HCV variants ($n \leq 118$) can be shared between mother and child and that the number of shared variants was higher in presence of maternal coinfection with HIV-1, compatible with loosening of the transmission bottleneck. Identification in one child of variants that were observed in the mother in the second trimester (21 weeks) of pregnancy but not at later time points indicates that mother-to-child HCV transmission can take place relatively early during gestation. Finally, substantial changes in HCV quasispecies composition were observed in 3 out of 5 children at or around 1 year of age, compatible with a shift in selective pressure. Taken together, these results provide insights into the timing, dynamics, and mechanisms involved in mother-to-child transmission of HCV and inform potential preventative strategies.

[243 words]

INTRODUCTION

HCV is one of the leading causes of chronic viral hepatitis, with an estimated 123 million HCV-infected persons worldwide (1) and possibly up to 5.2 million in the United States alone (2). HCV is transmitted by percutaneous exposure to infected blood or contaminated materials, commonly in the context of injection drug use (IDU) (3). Mother-to-child transmission (MTCT) of HCV also takes place in approximately 10% of cases (4,5). While the risk of vertical HCV transmission is arguably lower than that of other chronic viral pathogens such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), there are currently no effective means of preventing it. Indeed, standard of care HCV treatments, including drug combinations that comprise direct-acting antiviral agents, are contraindicated during pregnancy (6-12). In addition, whether programmed caesarean section is effective in preventing MTCT of HCV is unclear based on published evidence (13-17). When HCV is transmitted by contact with contaminated biological fluids, only a small fraction of the quasispecies is transmitted, a phenomenon called « transmission bottleneck » (18). Little is known regarding the existence, nature, characteristics, and biological properties of the transmission bottleneck in mother-to-child HCV transmission. In the case of HIV-1, it is well-established that only one variant is transmitted from mother to child in the majority of cases (19-22). Studies that analyzed quasispecies profile based on the sequence of hypervariable region 1 (HVR1) of the HCV E2 envelope protein in HCV-infected newborns and infants before or in absence of seroconversion suggested that MTCT of HCV may also involve a restricted number of viral variants (23-28). However, this issue has not yet been convincingly resolved. MTCT of HCV might take place earlier during gestation as compared with HIV-1 transmission, as the detection of HCV viral RNA in some infants in the first 3 days of life has suggested that early *in utero* infection was possible (29,30). Indeed, based on evidence of detectable HCV RNA several weeks after birth (29) and of the presence in the child of HCV variants that are not contemporaneous with the maternal quasispecies at birth (31),

it was estimated that more than one third of infected children acquire HCV by this route of transmission and up to one-half by late intrauterine and intra partum transmission. However, direct evidence for this is currently lacking. To better understand the nature of the bottleneck and clarify the timing of transmission, the HCV quasispecies based on E2 hypervariable regions 1-3 was characterized using next generation sequencing (NGS) and median-joining network analysis in 5 HCV-infected neonates and their mothers, including 3 women who were co-infected with HCV and HIV-1. Results showed that mothers and children shared multiple viral variants, and that their number was unexpectedly high in presence of maternal coinfection with HIV-1, compatible with a loose transmission bottleneck. Longitudinal analysis of variant identity and relatedness using median joining networks revealed that MTCT of HCV could have taken place *in utero* as early as the middle of the second trimester of pregnancy (21 weeks of gestation) in 1 of 5 cases. In addition, the positioning of variants found in the child at the root of new maternal clusters suggests that transmission of HCV from the child to the mother can also take place. Finally, striking turnover of the composition of the HCV quasispecies was observed in 3 out of 5 children during the first year of life, compatible with a shift in selective pressure. To the best of our knowledge, these results constitute the first direct evidence of early *in utero* transmission of HCV. In addition, they paint a picture of MTCT of HCV that is far different from that seen in the case of HIV-1, where a tight transmission bottleneck, perinatal as opposed to *in utero* transmission, and presence of single founder variants is the rule rather than the exception.

RESULTS

HCV-infected women and their HCV-infected children share large numbers of viral variants.

Five cases of MTCT of HCV were identified among participants to the Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) Mother-Child Cohort (Centre hospitalier universitaire [CHU] Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada). Three of the 5 HCV-infected women were also co-infected with HIV-1. Subjects were followed prospectively during the course of pregnancy. Their children were likewise regularly followed during childhood as per standard of care. None of the children contracted HIV-1 infection. Clinical and sociodemographic information on study subjects is summarized in Table 1. Clinical case histories are summarized in Supplemental Materials. The composition and structure of HCV quasispecies was studied based on analysis of the sequence of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene (nucleotide positions 1491-1787), which includes HVR1 and HVR2 (32,33), as determined using NGS. After quality control, a total of 94,932 sequences were obtained, representing an average of 9,493 sequences per subject (range = 2,091 - 18,973 sequences) and an average of 4,127 sequences per time point (range = 607 - 10,418 sequences). Multiple major (>30% relative frequency at any given time point) and minor HCV variants were observed in all subjects, with an average of 124 variants per time point (range = 16 - 298 variants) (Figure 1A). Long-term persistence of multiple minor and major variants was observed in all cases, and variant spectra tended to shift considerably between mothers and children and between successive time points, consistent with previous observations in various study groups (34-37). An average of 72.2 variants (range = 21 - 130 variants) were present in the children at the first available time point after birth. Variants that were shared between mother and child (*i.e.* 100% sequence identity over a segment of 297 nucleic acid residues) were observed in all cases, with the exception of the TVC31-TVC32 mother-child pair (Figure 1B). However, in that particular

case, the last maternal time point that was assayed was 3.4 years before delivery of the child as a result of loss to follow-up (Supplemental Materials). Overall, based on nucleic acid sequence identity, a total of 118 variants were shared between TVC55 (mother) and TVC56 (child), 4 between TVC79 (mother) and TVC80 (child), 2 between TVC189 (mother) and TVC190 (child), and 111 between TV385 (mother) and TV386 (child). In two cases (TVC55-TVC56 and TVC79-TVC80), transmission involved both major and minor variants, while in TV189-TV180 and TV385-TV386, only minor variants were transmitted. Of note, the two mother-child pairs in whom the highest numbers of shared variants were recorded (*i.e.* TVC55-TVC56 and TV385-TV386) involved mothers who were co-infected with HIV-1. The similarity between variant spectra obtained in the mothers and the children at various time points was examined by computing the Morisita-Horn similarity index (38) in a pairwise manner (Figure 1C). Finally, values of the Morisita-Horn index were significantly smaller when comparisons were made between within-patient time points than when maternal variant spectra were compared with child variant spectra ($p < 0.001$; Mann-Whitney U test), indicative of a higher within-patient than between-patient quasispecies similarity (Figure 1C). Taken together, these results are compatible with a tight transmission bottleneck in MTCT of HCV that becomes significantly relaxed in the presence of maternal coinfection with HIV-1.

Mother-to-child transmission of HCV can take place in utero as early as the second trimester of gestation.

Median joining network analysis of variant spectra isolated from all 5 mother-child pairs revealed complex population structures in which major and minor viral variants are extensively interlaced (Supplementals 2 and 3). In the case of the TVC31-TVC32 mother-child pair, the complexity of the population structure was undersized, possibly as a consequence of relatively low viral load in the mother and the child (Table 1). There is also comparatively reduced complexity of variant population

structure in TVC79-TVC80 mother-child pair, where viral load is low, at least in the mother (Table 1). In the case of the TVC189-TVC190 mother-child pair, interlacing is reduced, due in part to the fact that a single time point in the child was available for analysis. In all cases, discrete subpopulations (« variant communities ») were observed (Supplemental Figure 2 and 3). These communities were grouped around central variants that were either shared variants (e.g. TVC189-TVC190) or not (e.g. TVC31-TVC32). Overall, the majority of variant communities were comprised of variants from both mother and child, reflecting significant interconnectedness and extensive overlap in sequence space. Radiations of distinct groups of variants were observed in the TVC55-TVC56 and TV79-TVC80 mother-child pairs (Supplemental 2). In TVC56-TVC57, the radiation, which could represent the result of directional sequence evolution, only involves maternal variants. In TVC79-TVC80, these outliers invariably originated in the child. As mentioned above, 0 – 118 shared variants were observed between mother and child, and extensive sharing patterns were seen between various time points in pregnancy going back to the 21st week of gestation in TVC55-TVC56 and TVC79-TVC80. In the case of TVC55-TVC56, 31 variants (all minor) were identified that were shared between the infant and the mother in the second trimester of gestation but that were no longer found in the mother thereafter (Figure 2A). This is strongly indicative of a MTCT event taking place in utero in the middle of the second trimester, hence considerably earlier than previously thought (73). In addition, in the global quasispecies structure found in subjects TVC55-TVC56, the leftward radiation from the main cluster, which is entirely comprised of third trimester maternal variants, is linked to the main cluster by a unique variant (haplotype 502) isolated from the child. Haplotype 502, a minority variant (< 0.5%), which was found in the child at 13, 27, and 385 days of life, also lies on the most parsimonious path between the main cluster and the third trimester radiation. This finding raises the intriguing possibility that child-to-mother transmission (CTMT) of HCV might have occurred in the third trimester of gestation.

Evolution of HCV quasispecies in the first year of life in children infected by MTCT

In 3 of 4 cases that could be analyzed, a major shift in terms of evolution of the composition of the variant spectra was observed during the first year after birth, with values of the Morisita-Horn index of 0.042 (TVC32), 0.889 (TVC56), 0.00 (TVC80), and 0.019 (TVC386) between the last time point tested and the one immediately preceding it (Figure 1C). In the first 127 days after birth, quasispecies diversity expressed as the value of Shannon entropy was significantly lower than that measured between 135 and 385 days of age ($p = 0.0265$, Mann-Whitney U test) (Figure 3A). In contrast, in 3 cases out of 5, HCV viral load was higher in the first 127 days of life than between 135 and 385 days of age (Figure 3B). Taken together, these results are compatible with a model in which important changes in HCV quasispecies evolution take place during the first year of life in children who acquired HCV infection by MTCT.

DISCUSSION

HCV behaves like a quasispecies in its host, which is generally thought to contribute to immune escape and the establishment and maintenance of chronic infection (40, 41). Transmission between hosts is also thought to implicate only a minor sub-fraction of the viral quasispecies that may include variants capable of immune escape and/or exhibiting optimal replicative fitness (18, 42-45). Here we examined the transmission bottleneck in the context of MTCT of HCV. By studying evolution and identity of N-terminal nucleic acid sequences of E2 using NGS in 5 mothers who transmitted HCV to their child, we provided direct evidence that MTCT of HCV could in some cases involve an extensive number of distinct viral variants. This was particularly striking in the case of the TVC55-TVC56 and TVC385-TVC386 mother-child pairs, where respectively 118 and 111 maternal variants were identified in the child. Both TVC55 and TVC385 were coinfecting with HIV-1, a situation that was associated in some studies with an

increased rate of transmission of HCV from mother to child (4, 46, 47). It has been speculated that interference of HIV with the development, maintenance and general efficacy of HCV-specific humoral and cell-mediated immune responses leading to higher HCV viral load in the mother could be responsible for the enhanced transmission rates (4, 5, 47, 48). HIV infection in pregnancy was also associated with the development of chorioamnionitis (49-53), an inflammatory condition which could potentially result in the trophoblast barrier becoming compromised, leading to micro-haemorrhages and increases in the frequency and scope of opportunities for transplacental transfer of HCV to the foetus. These two mechanisms are not mutually exclusive. It is generally accepted that a significant share of cases of HCV transmission from mother to child involve in utero infection. To the best of our knowledge, our results provide the first piece of direct evidence in support of in utero infection taking place, in at least one case, in the middle of the second trimester of gestation. This has significant implications regarding HCV pathogenesis, as the presence of circulating HCV in the foetus during this time period could lead to long term tolerance to HCV antigens and loss of pathogen-specific immunocompetence (54-56). Early in utero infection was hypothesized to represent a possible contributing factor to the long-term persistent HCV seronegative status observed in a child who acquired HCV by MTCT (23, 28). Indeed, Results of the phylogenetic analysis performed on samples from subjects TVC55 and TVC56 also suggest that in some cases, bidirectional transfer of HCV leading to CTMT could take place during gestation. This finding is so far unique and its significance would be strengthened by studies on additional cases of vertical HCV transmission. However, it is well-established that cells of foetal origin can be found in the maternal circulation during pregnancy (maternal microchimerism), where they can even establish long-term residence (57). Hence, it is far from inconceivable that free HCV virions, immune complexes, and/or cell-associated HCV (58, 59) could find their way back from the foetus back into the maternal periphery. Limitations of this study include the fact that we only had the chance to examine a handful of cases of HCV MTCT. In addition, our NGS

analysis was limited to segment of 297 nucleic acid residues, i.e. ~3% of the entire HCV genome. Because of this, even though this portion of E2 contains the most genetically diverse region of the entire genome of the virus and is thus highly informative in quasispecies analysis, our results will tend to overestimate mother-child variant identity and underestimate the actual diversity of the HCV quasispecies contained in clinical specimens. Use of single-genome amplification and sequencing (43, 44, 60), which was not performed in the context of the present study, would have been the ideal approach to obtain unambiguous assessment and matching of HCV variant identity between the mother and her child. Finally, it has been argued that the most relevant populations of HCV variants are those compartmentalized in the liver, which houses a distinct quasispecies from that present in peripheral blood (61). Understandably, liver biopsies from pregnant women and infants enrolled in our study could not ethically be procured. On the whole, our results paint a rather different picture of MTCT of HCV than what was thought of until now. Instead of a mostly peripartum mode of transmission, we provide evidence for the existence in some cases of multiple transmission events taking place during the second half of pregnancy, possibly leading to bidirectional transfer of viral variants across the placental divide. This model is compatible with the lack of effectiveness of elective caesarean section for the prevention of MTCT of HCV (13-17). It is also compatible with a report from Babik *et al.*, who estimated that 10^{13} to 10^{14} HCV virions have access to the placental bed during an average pregnancy (62). Although issues of specific infectivity remain unresolved, the sheer magnitude of these numbers has one wondering how it is even possible that the rate of HCV transmission from mother to child stands at <10%. Survival analysis performed on 157 children with transfusion- and non-transfusion-acquired HCV infection revealed that spontaneous clearance tended to occur in the youngest of subjects (63). Hence it is possible that infants--or foetuses--infected with HCV would be able to clear infection at a higher rate than older children and adults, leading to an undervaluation of the actual rate of MTCT. Consistent with this, HCV-specific cell-mediated immune responses, which have been

associated with spontaneous or IFN-induced viral clearance in chimpanzees and humans (64-66), were detected at a higher frequency in transiently-viremic children as compared with children who become chronically infected (67). In addition, it is possible that maternal HCV-specific immunoglobulins that are transferred through the placenta during gestation may contribute to protect the foetus from infection (68, 69).

Overall, the picture of vertical HCV transmission is quite different from that of MTCT of HIV-1, a virus with a genome of similar size as that of HCV but with diametrically different biological properties and pathogenesis. In the case of HIV infection, there is generally a tight transmission bottleneck (presence of single founder variants) and MTCT mostly takes place in the perinatal period as opposed to *in utero* (19-22). In the case of HCV, results from the present study indicate that transmission can take place earlier in pregnancy (i.e. mid-gestation) and transmission of multiple variants can be observed under specific conditions that include maternal HIV coinfection. These results have important implications for the care of pregnant HCV-infected women and their children. If early in utero HCV transmission occurs with a significant frequency, which we think is likely but should be confirmed in larger studies, then, single-dose prophylactic regimens using direct-acting antiviral agents analogous to single-dose peripartum nevirapine protocols in HIV-1 infection (70, 71) are unlikely to be effective.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects.

Pregnant women infected with HCV (n = 2) or co-infected with HCV and HIV-1 (n = 3) were enrolled at the Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS), CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada, where the study was conducted. First, 2nd and 3rd trimesters of pregnancy were defined as 1-13, 14-28, and 29-41 weeks of gestation and gestational age was estimated based on fetal biometry. HCV infection in the child was diagnosed following detection of HCV RNA in plasma at birth (COBAS AMPLICOR HCV Test version 2.0; Roche Diagnostics, Montreal, Quebec, Canada). HCV plasma RNA levels were quantified using the COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test version 2.0 (Roche Diagnostics). HCV genotyping was performed as previously described (72). HIV-1 viral load was measured using the VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (Bayer, Pittsburgh, PA, USA), with a lower limit of detection of 1.70 log₁₀ HIV-1 RNA copies/ml plasma. Levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured on a Synchron LX20 system (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario, Canada). CD4⁺ T cell counts were measured by flow cytometry. Venous blood samples were collected from women and children at the time of medical follow up. In the case of child TVC386, a sample of umbilical cord blood was also obtained at the time of delivery. Serum samples were isolated by centrifugation, aliquoted to avoid repeated freeze-thaw cycles, and stored at -80°C. The study was approved by CHU Sainte-Justine's Institutional Review Board for ethics. Written informed consent was provided and medical follow up was offered for both mothers and children as per standard of care.

Viral RNA extraction and amplification.

Viral RNA was extracted from serum samples using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and eluted in nuclease-free water. Samples from mothers and children were processed separately to avoid cross-contamination. Viral RNA was then reverse transcribed using random hexamers and high-fidelity reverse transcriptase (Maxima RT, Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Nucleic acid segments encoding the N-terminal portion of E2, including HVR1 and HVR2 (nucleotide positions 1491-1787 of the H77 isolate), were amplified by nested PCR using a proofreading polymerase (Phusion, New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Primers were designed for each HCV genotype based on conserved regions flanking HVR1 and HVR2. Primers used in second-round PCR were engineered with appropriate « read » signals, adaptor sequences and multiplex identifiers (MID). Primer sequences are provided in Supplemental Materials. PCR conditions for first-round and second-round reactions were 98°C for 30 sec, followed by 35 cycles of 98°C for 15 sec, 68°C for 30 sec, and 72°C for 20 sec, and a final extension step of 10 minutes at 72°C.

Next generation sequencing (NGS).

PCR products were purified using DNA magnetic beads (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) at a ratio of 0.65:1, which was empirically determined to be the most specific (resolving) for fragments in the 600-700 bp range using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) (data not shown). Purified PCR product were quantified (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit, Life Technologies, Eugene, OR, USA) and were multiplexed in an equimolar pool (6 x 10⁻¹³ mol/product). Pyrosequencing was performed on a GS FLX+ Instrument (454 Sequencing, Roche, Penzberg, Germany) using Titanium Series Reagents (McGill University/Genome Quebec Genome Center, Montreal, Quebec, Canada). Error rates were estimated by sequencing corresponding

amplicons obtained using the phCMV-E1E2 plasmid (73). To evaluate potential primer usage bias, parallel HCV variant spectra were constructed using amplification-cloning and Sanger sequencing procedures for the TVC79-TVC80 mother-child pair (Supplemental Information).

Analysis of nucleic acid sequence data.

After de-multiplexing, sequences < 150 nucleic acid residues were filtered using a local implementation of Galaxy (74-76). A Python script (Seq_pattern.py) was used to isolate and align sequences on the basis of forward primer sequences (available from the authors upon request). Sequences were then manually sorted using MEGA version 6.0 (77) to exclude homopolymer-related frameshifts resulting from pyrosequencing errors and PCR artifacts. Insertion-deletions were also excluded as they often could not be discriminated from biases typical of pyrosequencing. Isolated sequences were truncated from position 1491-1787 and frequencies of variants were assessed using Galaxy. The relative frequencies of individual HCV variants were compared between time points and study subjects using a Python script (Frequency.py; available from the authors upon request). Variant profiles were produced and visualized using Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA). Quasispecies diversity in a given subject or time point was expressed as Shannon entropy and calculated using the formula:

$$H = \frac{\sum_{i=1}^n P_i \log P_i}{\log N}$$

Where H represents Shannon entropy, P_i is the relative proportion of variant i , and N is the total number of variants. Similarity between variant spectra was examined by computing the Morisita-Horn similarity index (38) as implemented in EstimateS version 9.1.0 (78).

Phylogenetic analysis.

FASTA files for mother-child pairs were merged and converted to RDF format using DnaSP version 5 (79). Haplotypes were categorized using a Python script (RDF.py) that merged output files of Frequency.py (relative frequencies per variant per time-point) with RDF files in order to assign haplotypes to time-points/patients (available from the authors upon request). Median joining networks (MJN) (28, 80) were then computed using Network version 4.612 and drawn using Network Publisher version 2.0.0.1 (Fluxus Technology, Kiel, Germany), with epsilon = 0, no star-contraction, and post processing simplification. Nucleotide substitution models were tested using MEGA. Maximum likelihood phylogenetic trees were subsequently drawn based on the Kimura 2-parameters model and gamma distributed rates (discrete value of 5).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Martine Caty and Silvie Valois for expert technical support and François-Loïc Cosset, INSERM U1111, ENS Lyon, France, for providing the phCMV-E1E2 vector. Supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Réseau SIDA et MI of Fonds de la recherche du Québec-santé (FRQS) to H.S. S.F.D. and A.L. were recipients of graduate scholarships from Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine/Fondation des Étoiles and FRQS. A.L. and A.L.C. were recipients of graduate (A.L.) and post-graduate (A.L.C.) scholarships from CIHR.

REFERENCES

1. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5: 558-567.
2. Chak E, Talal AH, Sherman KE, Schiff ER, Saab S. 2011. Hepatitis C virus infection in USA: an estimate of true prevalence. *Liver Int* 31: 1090-1101.
3. Alter MJ. 1997. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26: 62S-65S.
4. Thomas SL, Newell ML, Peckham CS, Ades AE, Hall AJ. 1998. A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. *Int J Epidemiol* 27: 108-117.
5. Le Campion A, Larouche A, Fauteux-Daniel S, Soudeyns H. 2012. Pathogenesis of hepatitis C during pregnancy and childhood. *Viruses* 4: 3531-3550.
6. Kilham L, Ferm VH. 1977. Congenital anomalies induced in hamster embryos with ribavirin. *Science* 195: 413-414.
7. Ferm VH, Willhite C, Kilham L. 1978. Teratogenic effects of ribavirin on hamster and rat embryos. *Teratology* 17: 93-101.
8. Roberts SS, Miller RK, Jones JK, Lindsay KL, Greene MF, Maddrey WC, Williams IT, Liu J, Spiegel RJ. 2010. The Ribavirin Pregnancy Registry: Findings after 5 years of enrollment, 2003-2009. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88: 551-559.
9. Trotter JF, Zygmunt AJ. 2001. Conception and pregnancy during interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*: 32, 76-78.
10. Labarga P, Pinilla J, Cachorro I, Ruiz Y. 2007. Infant of 22 months of age with no anomalies born from a HCV- and HIV-infected mother under treatment with pegylated interferon, ribavirin and antiretroviral therapy during the first 16 weeks of pregnancy. *Reprod Toxicol* 24: 414-416.

11. Dubois J, Hershon L, Carmant L, Belanger S, Leclerc JM, David M. 1999. Toxicity profile of interferon alfa-2b in children: A prospective evaluation. *J Pediatr* 135: 782-785.
12. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/201917s007lbl.pdf. Accessed 22-09-2014.
13. Marine-Barjoan E, Berrebi A, Giordanengo V, Favre SF, Haas H, Moreigne M, Izopet J, Tricoire J, Tran A, Pradier C, Bongain A. 2007. HCV/HIV co-infection, HCV viral load and mode of delivery: risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus? *AIDS* 21: 1811-1815.
14. Gibb DM, Goodall RL, Dunn DT, Healy M, Neave P, Cafferkey M, Butler K. 2000. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* 2000, 356, 904-907.
15. European Paediatric Hepatitis C Virus Network. 2005. A significant sex--but not elective cesarean section--effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 192: 1872-1879.
16. Ghamar Chehreh ME, Tabatabaei SV, Khazanehdari S, Alavian SM. 2011. Effect of cesarean section on the risk of perinatal transmission of hepatitis C virus from HCV-RNA+/HIV- mothers: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 283: 255-260.
17. Arshad M, El-Kamary SS, Jhaveri R. 2011. Hepatitis C virus infection during pregnancy and the newborn period--are they opportunities for treatment? *J Viral Hepat* 18: 229-236.
18. Wang GP, Sherrill-Mix SA, Chang KM, Quince C, Bushman FD. 2010. Hepatitis C virus transmission bottlenecks analyzed by deep sequencing. *J Virol* 84: 6218-6228.
19. Wolinsky SM, Wike CM, Korber BT, Hutto C, Parks WP, Rosenblum LL, Kunstman KJ, Furtado MR, Muñoz JL. 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 255: 1134-1137.

20. Verhofstede C, Demecheleer E, De Cabooter N, Gaillard P, Mwanyumba F, Claeys P, Chohan V, Mandaliya K, Temmerman M, Plum J. 2003. Diversity of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env sequence after vertical transmission in mother-child pairs infected with HIV-1 subtype A. *J Virol* 77: 3050-3057.
21. Samleerat T, Braibant M, Jourdain G, Moreau A, Ngo-Giang-Huong N, Leechanachai P, Hemvuttiphon J, Hinjiranandana T, Changchit T, Warachit B, Suraseranivong V, Lallemand M, Barin F. 2008. Characteristics of HIV type 1 (HIV-1) glycoprotein 120 env sequences in mother-infant pairs infected with HIV-1 subtype CRF01_AE. *J Infect Dis* 198: 868-876.
22. Russell ES, Kwiek JJ, Keys J, Barton K, Mwapasa V, Montefiori DC, Meshnick SR, Swanstrom R. 2011. The genetic bottleneck in vertical transmission of subtype C HIV-1 is not driven by selection of especially neutralization-resistant virus from the maternal viral population. *J Virol* 85: 8253-8262.
23. Larouche A, Gaëtan G, El-Bilali N, Quesnel-Vallières M, Martin SR, Alvarez F, Shoukry NH, Soudeyns H. 2012. Seronegative hepatitis C virus infection in a child infected via mother-to-child transmission. *J Clin Microbiol* 50: 2515-2519.
24. Manzin A, Solforosi L, Debiaggi M, Zara F, Tanzi E, Romano L, Zanetti AR, Clementi M. 2000. Dominant role of host selective pressure in driving hepatitis C virus evolution in perinatal infection. *J Virol* 74: 4327-4334.
25. Canobio S, Guilbert CM, Troesch M, Samson J, Lemay M, Pelletier VA, Bernard-Bonnin AC, Kozielski R, Lapointe N, Martin SR, Soudeyns H. 2004. Differing patterns of liver disease progression and hepatitis C virus (HCV) quasispecies evolution in children vertically coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 42: 4365-4369.
26. Farci P, Quinti I, Farci S, Alter HJ, Strazzera R, Palomba E, Coiana A, Cao D, Casadei AM, Ledda R, Iorio R, Vegnente A, Diaz G, Tovo PA. 2006. Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8475-8480.

27. Gerotto M, Resti M, Dal Pero F, Migliorato I, Alberti A, Bortolotti F. 2006. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in children with chronic hepatitis C. *Infection* 34: 62-65.
28. Escobar-Gutiérrez A, Soudeyns H, Larouche A, Carpio-Pedroza JC, Martinez-Guarneros A, Vazquez-Chacon CA, Fonseca-Coronado S, Yamasaki LH, Ruiz-Tovar K, Cruz-Rivera M. 2013. Vertical transmission of hepatitis C virus: a tale of multiple outcomes. *Infect Genet Evol* 20:465-70.
29. Resti M, Azzari C, Mannelli F, Moriondo M, Novembre E, de Martino M, Vierucci A. 1998. Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection. *BMJ* 317: 437-441.
30. Mok J, Pembrey L, Tovo PA, Newell ML, European Paediatric Hepatitis C Virus Network. 2005. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? *Arch Dis Child* 90: F156-F160.
31. Pollack H, Hou Z, Hughes AL, Borkowsky W. 2004. Perinatal transmission and viral evolution of hepatitis C virus quasispecies in infants coinfecting with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 36: 890-899.
32. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M, Han JH. 1991. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180(2): 842-848.
33. Kato N, Ootsuyama Y, Tanaka T, Nakagawa M, Nakazawa T, Muraisho K, Ohkoshi S, Hijikata M, Shimotohno K. 1992. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res* 22(2): 107-123.
34. Farci P, Quinti I, Farci S, Alter HJ, Strazzera R, Palomba E, Coiana A, Cao D, Casadei AM, Ledda R, Iorio R, Vegnente A, Diaz G, Tovo PA. 2006. Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8475-8480.

35. Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., Strazzera, A., Chien, D. Y., Munoz, S. J., Balestrieri, A., Purcell, R. H., and Alter, H. J. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288: 339-344.
36. Farci P, Strazzera R, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, Peddis G, Usai F, Serra G, Chessa L, Diaz G, Balestrieri A, Purcell RH. 2002. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3081-3086.
37. Quesnel-Vallières M, Lemay M, Lapointe N, Martin SR, Soudeyns H. 2008. HCV quasispecies evolution during treatment with interferon alfa-2b and ribavirin in two children coinfecting with HCV and HIV-1. *J Clin Virol* 43: 236-240.
38. Horn HS. 1966. Measurement of "overlap" in comparative ecological studies. *Am Naturalist* 100(914): 419-424.
39. Indolfi G, Resti M. 2009. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 81(5): 836-843.
40. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66(5): 3225-3229.
41. Farci P, Purcell RH. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 20(1): 103-126.
42. Honegger JR, Kim S, Price AA, Kohout JA, McKnight KL, Prasad MR, Lemon SM, Grakoui A, Walker CM. 2013. Loss of immune escape mutations during persistent HCV infection in pregnancy enhances replication of vertically transmitted viruses. *Nat Med* 19(11): 1529-1533.
43. Li H, Stoddard MB, Wang S, Blair LM, Giorgi EE, Parrish EH, Learn GH, Hraber P, Goepfert PA, Saag MS, Denny TN, Haynes BF, Hahn BH, Ribeiro RM, Perelson AS, Korber BT, Bhattacharya T, Shaw

GM. 2012. Elucidation of hepatitis C virus transmission and early diversification by single genome sequencing. *PLoS Pathog* 8(8): e1002880.

44. D'Arienzo V, Moreau A, D'Alteroche L, Gissot V, Blanchard E, Gaudy-Graffin C, Roch E, Dubois F, Giraudeau B, Plantier JC, Goudeau A, Roingard P, Brand D. 2013. Sequence and functional analysis of the envelope glycoproteins of hepatitis C virus variants selectively transmitted to a new host. *J Virol* 87(24): 13609-13618.

45. Brown RJ, Hudson N, Wilson G, Rehman SU, Jabbari S, Hu K, Tarr AW, Borrow P, Joyce M, Lewis J, Zhu LF, Law M, Kneteman N, Tyrrell DL, McKeating JA, Ball JK. 2012. Hepatitis C virus envelope glycoprotein fitness defines virus population composition following transmission to a new host. *J Virol* 86(22):11956-11966.

46. Papaevangelou V, Pollack H, Rochford G, Kokka R, Hou Z, Chernoff D, Hanna B, Krasinski K, Borkowsky W. 1998. Increased transmission of vertical hepatitis C virus (HCV) infection to human immunodeficiency virus (HIV)-infected infants of HIV- and HCV-coinfected women. *J Infect Dis* 178(4): 1047-1052.

47. Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ. 2014. Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 59(6): 765-773.

48. Polis CB, Shah SN, Johnson KE, Gupta A. 2007. Impact of maternal HIV coinfection on the vertical transmission of hepatitis C virus: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 44(8): 1123-1131.

49. Chandwani S, Greco MA, Mittal K, Antoine C, Krasinski K, Borkowsky W. 1991. Pathology and human immunodeficiency virus expression in placentas of seropositive women. *J Infect Dis* 163(5): 1134-1138.

50. Temmerman M, Nyong'o AO, Bwayo J, Fransen K, Coppens M, Piot P. 1995. Risk factors for mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus-1 infection. *Am J Obstet Gynecol* 172(2 Pt 1): 700-705.

51. Bhoopat L, Khunamornpong S, Sirivatanapa P, Rithaporn T, Lerdsrimongkol P, Thorner PS, Bhoopat T. 2005. Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period. *Mod Pathol* 18(10): 1357-1364.
52. Patterson BK, Behbahani H, Kabat WJ, Sullivan Y, O'Gorman MR, Landay A, Flener Z, Khan N, Yogev R, Andersson J. 2001. Leukemia inhibitory factor inhibits HIV-1 replication and is upregulated in placentae from nontransmitting women. *J Clin Invest* 107(3): 287-294.
53. Airoidi J, Berghella V. 2006. Hepatitis C and pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 61(10): 666-672.
54. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172(4379): 603-606.
55. Silverstein AM. 1964. Ontogeny of the immune response. *Science* 144(3625): 1423-1428.
56. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, Lee TH, Nixon DF, McCune JM. 2008. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 322(5907): 1562-1565.
57. Jeanty C, Derderian SC, Mackenzie TC. 2014. Maternal-fetal cellular trafficking: clinical implications and consequences. *Curr Opin Pediatr* 26(3): 377-382.
58. Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV, Michalak TI. 2004. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol* 78(11): 5867-5874.
59. Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Betti L, Gambineri E, de Martino M, Resti M. 2008. Higher risk of hepatitis C virus perinatal transmission from drug user mothers is mediated by peripheral blood mononuclear cell infection. *J Med Virol* 80(1): 65-71.
60. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas EK, Bixby CJ, Bazmi H, Rock D, Falloon J, Davey RT Jr, Dewar RL, Metcalf JA, Hammer S, Mellors JW, Coffin JM. 2005. Multiple, linked human

immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J Clin Microbiol* 43(1): 406-413.

61. Cabot B, Esteban JI, Martell M, Genescà J, Vargas V, Esteban R, Guardia J, Gómez J. 1997. Structure of replicating hepatitis C virus (HCV) quasispecies in the liver may not be reflected by analysis of circulating HCV virions. *J Virol* 71(2): 1732-1734.

62. Babik JM, Cohan D, Monto A, Hartigan-O'Connor DJ, McCune JM. 2011. The human fetal immune response to hepatitis C virus exposure in utero. *J Infect Dis* 203(2): 196-206.

63. Yeung LT, To T, King SM, Roberts EA. 2007. Spontaneous clearance of childhood hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 14(11): 797-805.

64. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10: 439-449.

65. Lechner F, Wong DKH, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191: 1499-1512.

66. Badr G, Bedard N, Abdel-Hakeem MS, Trautmann L, Willems B, Villeneuve JP, Haddad EK, Sekaly RP, Bruneau J, Shoukry NH. 2008. Early interferon therapy for HCV rescues poly-functional long-lived CD8⁺ memory T cells. *J Virol* 82: 10017-10031.

67. El-Kamary SS, Hashem M, Saleh DA, Abdelwahab SF, Sobhy M, Shebl FM, Shardell MD, Strickland GT, Shata MT. 2013. Hepatitis C virus-specific cell-mediated immune responses in children born to mothers infected with hepatitis C virus. *J Pediatr* 162(1): 148-154.

68. Brambell FW, Halliday R, Brierley J, Hemmings WA. 1954. Transference of passive immunity from mother to young. *Lancet* 266: 964-965.

69. Simister NE. 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21: 3365-3369.

70. Guay LA, Musoke P, Fleming T, Bagenda D, Allen M, Nakabiito C, Sherman J, Bakaki P, Ducar C, Deseyve M, Emel L, Mirochnick M, Fowler MG, Mofenson L, Miotti P, Dransfield K, Bray D, Mmiro F, Jackson JB. 1999. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* 354(9181): 795-802.
71. Jackson JB, Musoke P, Fleming T, Guay LA, Bagenda D, Allen M, Nakabiito C, Sherman J, Bakaki P, Owor M, Ducar C, Deseyve M, Mwatha A, Emel L, Duefield C, Mirochnick M, Fowler MG, Mofenson L, Miotti P, Gigliotti M, Bray D, Mmiro F. 2003. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* 362(9387): 859-868.
72. Murphy D, Willems B, Delage G. 1994. Use of the 5' noncoding region for genotyping hepatitis C virus. *J Infect Dis* 169: 473-475.
73. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197: 633-642.
74. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, The Galaxy Team. 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* 11(8): R86.
75. Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, Nekrutenko A, Taylor J. 2010. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 19: Unit 19.10.1-21.
76. Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D, Albert I, Taylor J, Miller W, Kent WJ, Nekrutenko A. 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Research* 15(10): 1451-1455.

77. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12): 2725-2729.
78. Colwell, R. K. 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
79. Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
80. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.

FIGURE LEGENDS

Table 1. Clinical information on the study subjects. Odd numbers in the patient identifiers denote the mothers, even numbers denote children, and asterisks denote maternal co-infection with HIV-1.

Patient	Days from birth	HCV genotype	HCV viral load UI/ml	AST UI/l	ALT UI/l	HIV	HIV viral load UI/ml	CD4 Count/mm3	Rx	Mother's age at birth	DPA	Delivery mode	Nb of sequences	HCV variants sequenced	
*TVC31	-1247	+	1a	168561	42	38	+		252	AZT/3TC	30,6	?	vaginal	5068	16
TVC32	20	+	1a				-	neg	-	AZT/3TC				1740	21
	188			69327	76	51	-	neg	2438	-				2630	42
*TVC55	-128	+	1a	5220000	22	20		377	620	-		40,1	vaginal	6461	298
	-23			1910000	29	19	+	<50	612	-	33,5			7815	86
	-1			1164600	39	26		<50	576	AZT iv				2875	264
TVC56	13			1 458 222	31	23		neg	-	AZT-3TC-nfv				9684	215
	27	+	1a	48 164 730	31	28	-	neg	-					2569	130
	210			5849226	256	341		neg	2303	-				2218	146
	385			8263263	88	119		neg	-	-				9962	219
TVC79	-126	+	1a	259000	35	44		neg	-	-		38,2	vaginal	7623	50
	-77			109000	22	21	-	neg	-	-	36			9558	66
	-8			301000	25	18		neg	340	-				1792	111
TVC80	43			21000000	26	18		neg	-	-				3235	85
	148	+	1a	12975960	49	41	-	neg	-	-				2886	146
	379			2160000	75	83		neg	-	-				807	48
TVC189	-92	+	4a	2090000	81	86	-	neg	-	-	35,2	37,3	vaginal	2831	160
	-21			1648623	49	62		neg	-	-				607	67
TVC190	127	+	4a	1417668	63	50	-	nd		-				2091	52
*TV385	-13	+	1b	13400000	20	19	+	2400	704	Yes, Rx unknown	26,2	39	vaginal	10418	161
TV386	CS			17406	41	14			1287	AZT/3TC				1653	294
	30	+	1b	1387992	39	25	-	neg						3012	29
	366			1003509	101	87		neg		-				1695	154

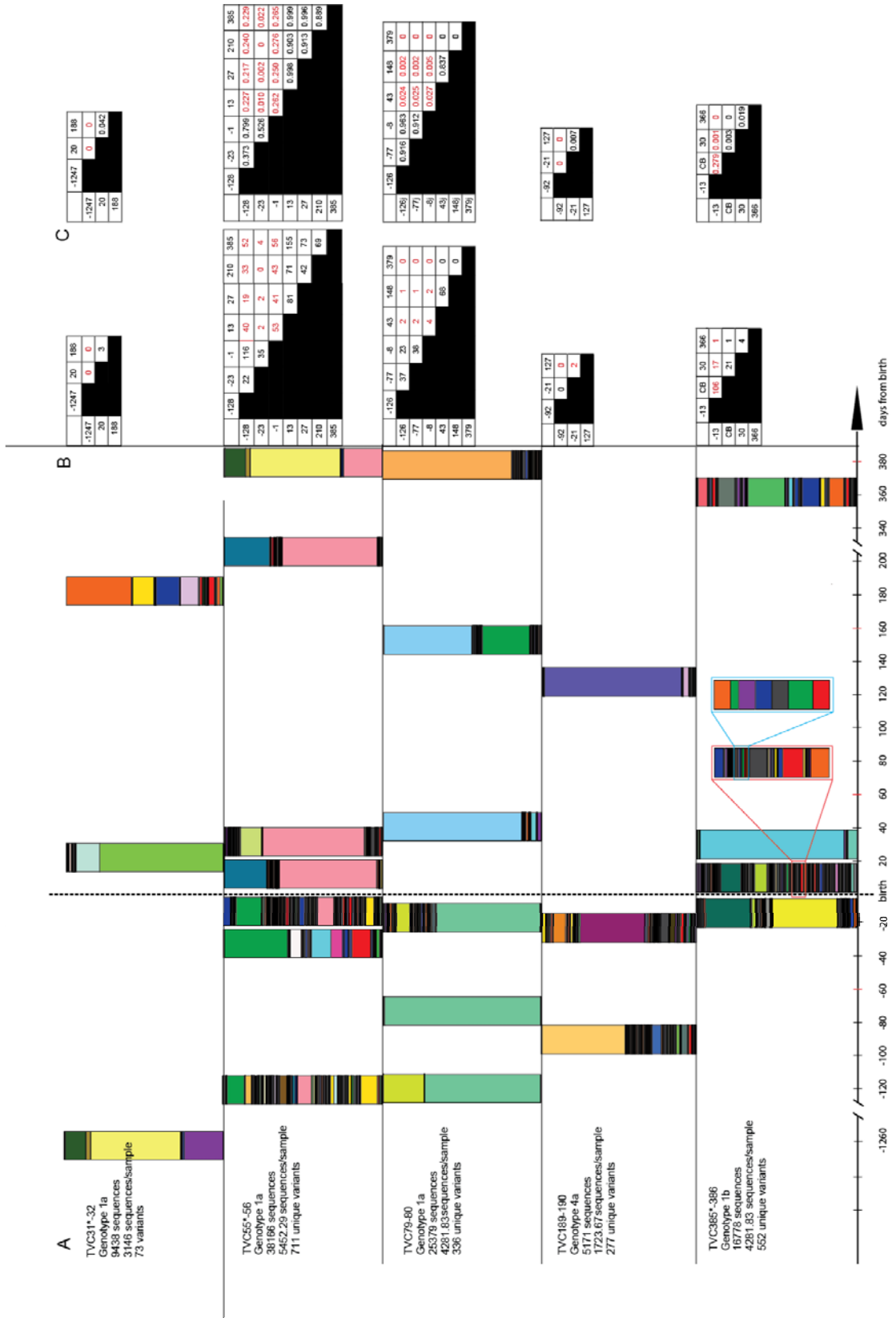


Figure 1. Longitudinal analysis of HCV quasispecies diversity in 5 cases of mother-to-child transmission. A. Color-coded variant spectra based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene (nucleotide positions 1491-1787, except in the case of the TVC189-TVC190 mother-child pair, where nucleotide positions were 1491-1790). The dashed vertical line represents the time of childbirth, with maternal variant spectra on the left and infant spectra on the right. Odd numbers in the patient identifiers denote the mothers, even numbers denote children, and asterisks denote maternal co-infection with HIV-1. Each color represents a unique variant in longitudinal analysis but not in between-patient analysis. In the case of the TVC385-TVC386 mother-child pair (bottom panel), the variant spectrum was scaled up to highlight the actual degree of quasispecies complexity obtained as a result of NGS. B. Variant identity matrices based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of E2 (nucleotide positions 1491-1787, except in TVC189-TVC190, where nucleotide positions were 1491-1790). Numbers highlighted in red represent shared variants between mother and child. C. Quasispecies similarity matrices based on pairwise computation of the Morisita-Horn similarity index (38), for which a value of 0 represents a total absence of similarity and a value of 1 represents total identity of the respective variant spectra. Negative numbers relate to gestational age in the mother (days), whereas positive numbers relate to the age of the child (days).. CB: cord blood.

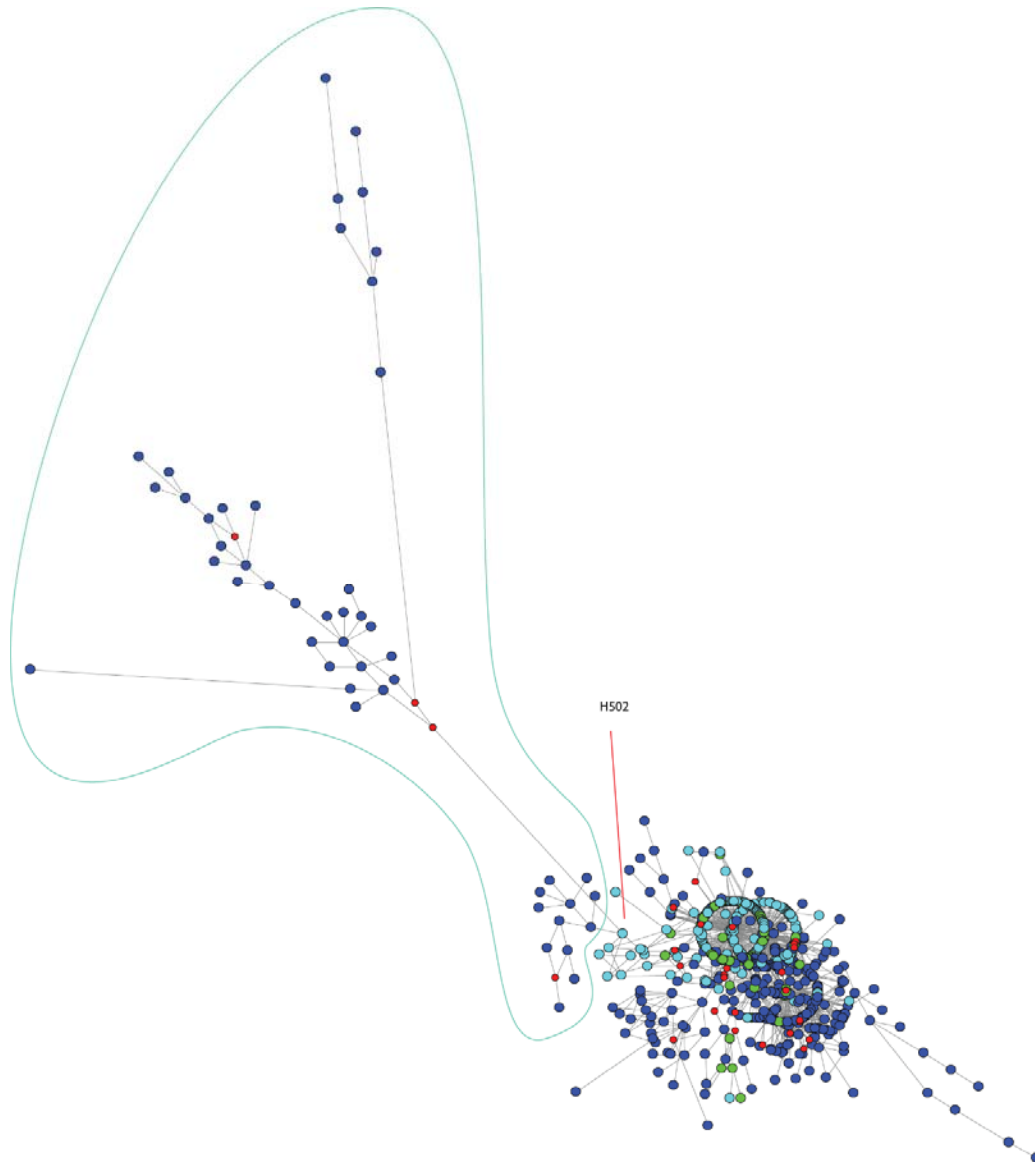


Figure 2. Phylogenetic analysis of a second bottleneck detected post mother to child transmission.

Neighbor-joining networks were constructed as described under Materials and Methods based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene (nucleotide positions 1491-1787, except in the case of the TVC189-TVC190 mother-child pair, where nucleotide positions were 1491-1790). In dark blue, mother's variants. In light turquoise, infant's variants. The solid line represent a cluster of mother's variants spawning from child's variant H502. Dots in red are hypothetical vectors necessary to the construction of the network.

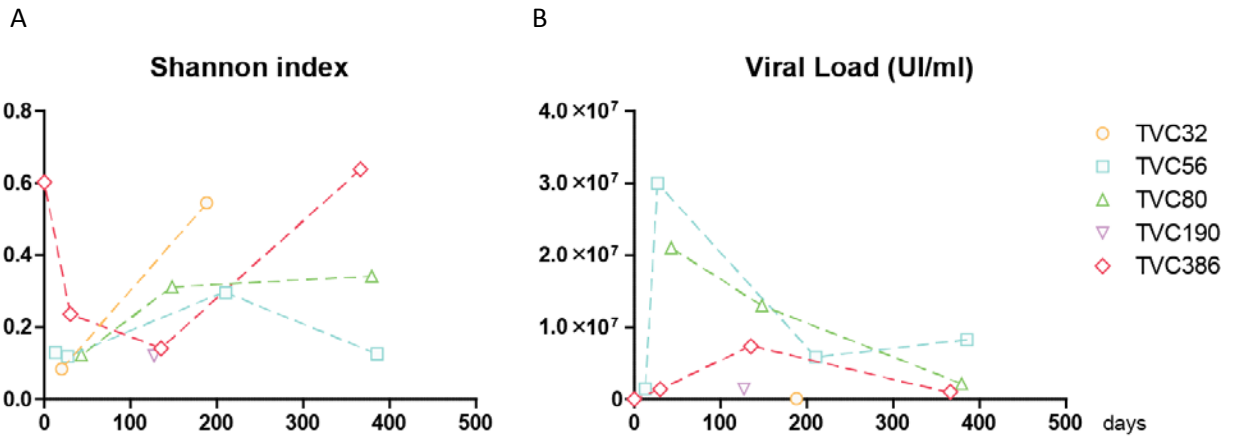


Figure 3. Early childhood viral loads and Shannon's diversity index A. Normalized Shannon's diversity index based on quasispecies structure considering the nucleotide positions 1491-1787 of HCV and B. Viral load (UI/ml) for 5 juvenile patients longitudinally followed longitudinally.

SUPPLEMENTAL MATERIALS

Supplemental 1: Clinical case histories

TVC31*-32

TVC31 is the mother of TVC32. We loss follow up of TVC31 for approximately 4 years and the child was referenced to the CMIS after delivery. The mother is Caucasian and the father, African. TVC31 delivered vaginally at the age of 30.58 years after a gestation of 38 weeks. The baby weighted 2.400 kg at birth. Although TVC31 has been known to be coinfectd with HIV-1, no viral load was detected 2 weeks before birth (<500UI/ml). The clade of HIV-1 is unknown. The baby was administrated zidovudine, lamivudine and nelfinavir for 6 weeks starting in the first 8-12 hours of life. The mother has developed a neprholithiasis during pregnancy. The baby was weaned of methadone as the mother was using it throughout pregnancy. The child was repeatedly reported PCR + and had HCV-specific Abs until tested PCR - for two consecutive tests at the age of 1.7 years old. Rx of the mother at birth to verify

TVC55*-56

TVC55 is the mother of TVC56. TVC55 is Caucasian and delivered vaginally at the age of 33.5 years after a gestation of 40.1 weeks. The baby weighted 3.030 kg at birth with APGAR scores of 9-9-9 taken respectively at 1, 5 and 10 minutes. HIV-1 clade B viral load was <50 copies 2 weeks before delivery. TVC55 was given intravenous AZT during labor. The baby was administrated AZT, 3TC and nelfinavir for 6 weeks starting in the first 8-12 hours of life. The newborn suffered of a hemangioma. The child was repeatedly reported PCR + until 7.9 years of age where both PCR and viral load were negative (<50 copies/ml). Subsequently, we lost follow up.

TVC79-80

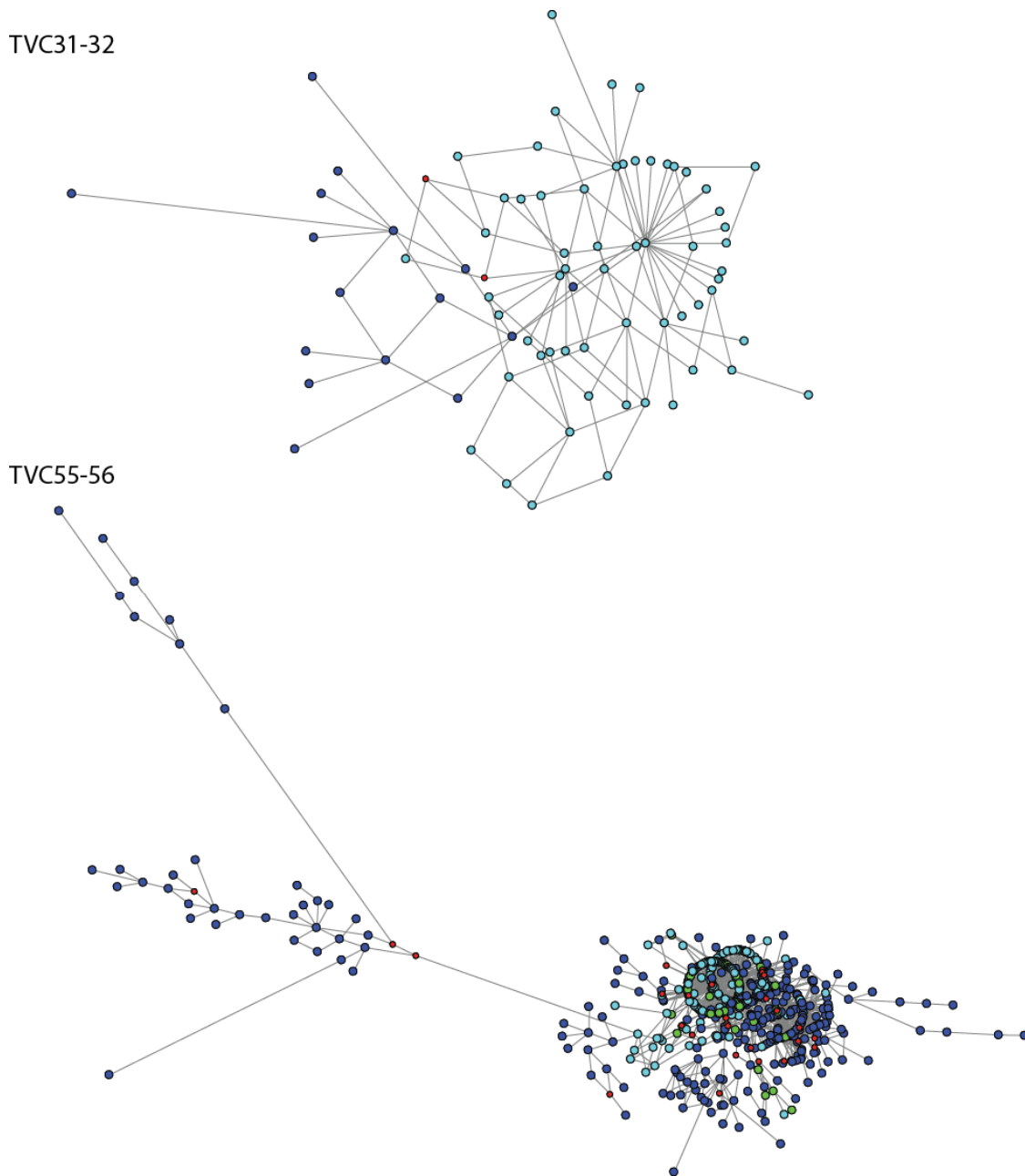
TVC79 is the mother of TVC80. TVC 79 is Caucasian and delivered vaginally at the age of 36 years old after 38 weeks of gestation. The baby weighted 2.325 kg with APGAR scores of 6-8-8 taken respectively at 1, 5 and 10 minutes. The mother was not infected with HIV. No complications were associated with pregnancy. The infant was continuously reported PCR + by the age of 5.1 years.

TVC189-190

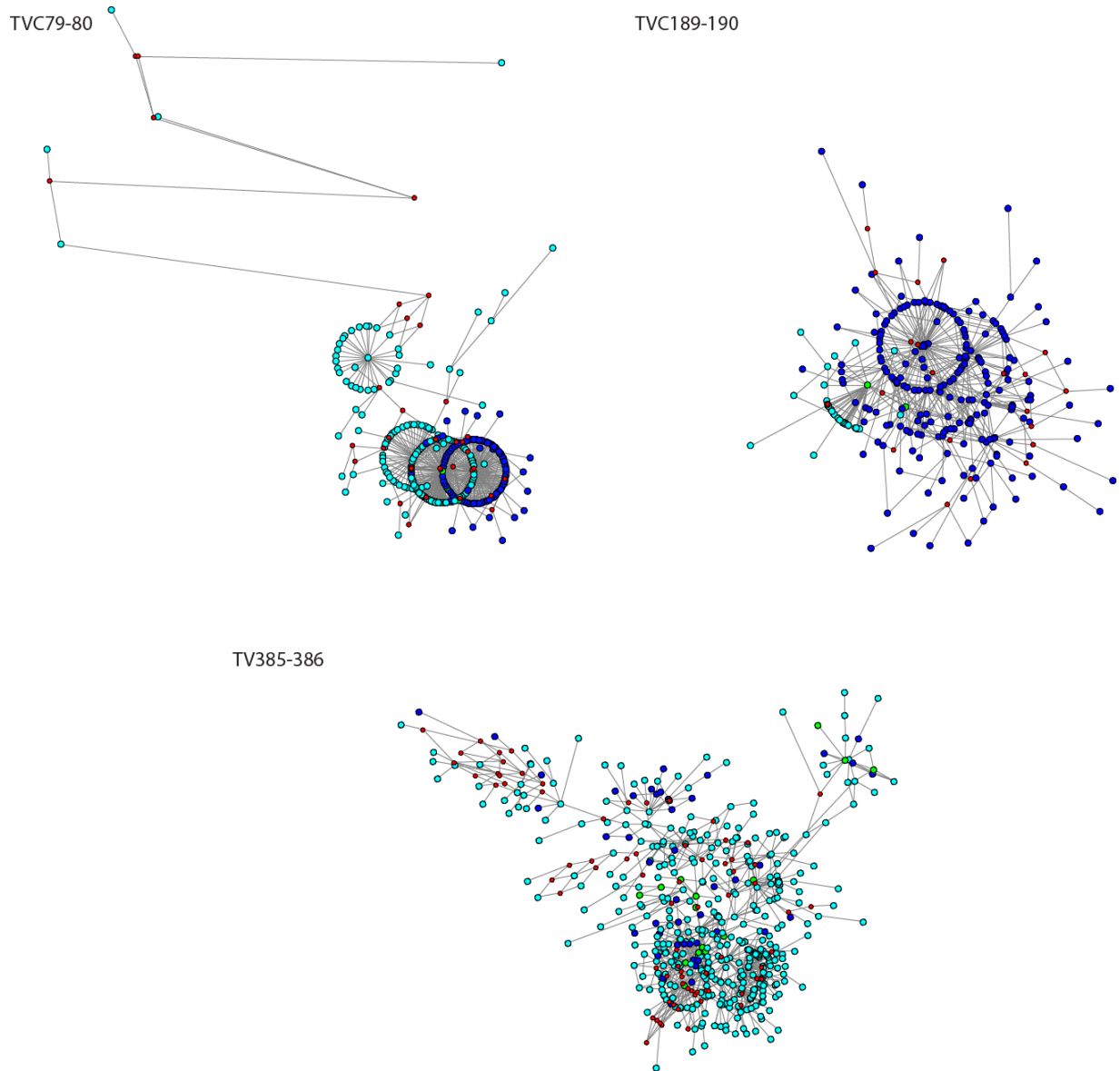
TVC189 is the mother of TVC190. TVC189 has Egyptian origins and delivered vaginally at the age of 35.2 years after 37.2 weeks of pregnancy. The baby weighted 2350 kg with APGAR scores of 8-9-9 taken respectively at 1, 5 and 10 minutes. The mother was not infected with HIV. The mother developed a cholestasis and pleuritis possibly due to hepatic tissue damage. The child was repeatedly reported PCR+ until 3.1 years old where we loss follow up after the family left the country.

TV385*-386

TV385 is the mother of TV386. TV385 is Argentine and delivered vaginally after a pregnancy of 38-39 weeks. The baby weighted 3.185 kg with APGAR scores of 10-10-10. The mother was infected with HIV-1 from an unknown clade. Viral load of HIV-1 was 2400 UI/ml 13 days before birth. TV385 was given undetermined Rx preventive of MTCT of HIV during labor. The baby was administrated AZT and 3TC for 6 weeks starting in the first 8-12h of life. No complication were reported for both mother and child. The mother was using multiple drugs throughout pregnancy. The newborn was weaned of morphine at birth. The child was still PCR positive for HCV by the age of 14 years old.



Supplemental 2: Neighbor joining phylogenetic network based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene (nucleotide positions 1491-1787 of the H77 isolate) is represented for TVC31-TVC32 and TVC55-56 mother and child pairs. In dark blue, mother's variants. In light turquoise, infant's variants. Green dots are variants shared between mother and child. Dots in red are hypothetical vectors necessary to the construction of the network.



Supplemental 3: Neighbor joining phylogenetic network based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene (nucleotide positions 1491-1787 of the H77 isolate, except for TVC189-190 where nucleotide positions are 1491-1790) is represented for TVC79-80, TVC189-190 and TV385-386 mother and child pairs. In dark blue, mother's variants. In light turquoise, infant's variants. Green dots are variants shared between mother and child. Dots in red are hypothetical vectors necessary to the construction of the network. The network of TVC79-80 mother and child pair has been adjusted to be visualized on a single figure

Supplemental 4: Genotype specific primers and control primers. Barcoded primers were used following manufacturer's instruction for barcoding, read signal and adaptor sequence design which are located at the 5' terminal position of the sens primer (Roche 454 at Genome Quebec, Montreal, Canada).

Genotype and primer	Outer/Inner primer	Polarity	Sequence (5'-3')	Position*	Size of PCR product (bp)
1a					
Fext-1a	Outer	Sens	GGCATGGGATATGATGATG	1295-1313	1269
Rext-1a	Outer	Antisens	ATGAGTARCATCATCCA	2547-2563	
Fspec-1a	Inner	Sens	TCCATGGTGGGGAACCTGGGCGAA	1428-1450	578
Rev-1a	Inner	Antisens	ATCCAGGTGCAACCGAACCAATTGCC	1980-2005	
1b					
Fext-1b2	Outer	Sens	ATGGCTTGGGAYATGAT	1293-1309	1123
Rext-1b2	Outer	Antisens	GRTGGATYAARCCRGTTGA	2397-2415	
For-1b	Inner	Sens	GCGGGCCTTGCCTACTATTCCATGG	1410-1434	623
Rev-1b	Inner	Antisens	CACGTCTTGGTGAACCCAGTGC	2011-2032	
4a					
Fext-4a	Outer	Sens	TGATGAACTGGAGTCCAAC	1309-1327	1138
Rext-4a	Outer	Antisens	AGGTAAGTGGACGTCCACG	2429-2446	
For-4a	Inner	Sens	GCYAATTGGGCCAAAGTCATC	1437-1457	679
Rev-4a	Inner	Antisens	GTCTCCGGATGCTTCTGAA	2097-2116	
Sanger (1a)					
NS1a		Sens	ATAACGGGTCACCGCATGGCATGGGATAT	1278-1312	612
NS1b		Antisens	CACCACCAGGGGCTGGGAGTGAAGCAAT	1861-1889	
ER2Stu		Antisens	CCAGCGGAGGCCTGGTGTGTTAAGG	1955-1980	706
E ₂ 814-842		Antisens	GGGCTGAGCTCGGACCTGTCCCTGTCTTC	2304-2332	1055

Supplemental 5. Longitudinal analysis of HCV quasispecies diversity in 5 cases of mother-to-child transmission. A. Color-coded variant spectra based on amino acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene (nucleotide positions 1491-1787, except in the case of the TVC189-TVC190 mother-child pair, where nucleotide positions were 1491-1790). The dashed vertical line represents the time of childbirth, with maternal variant spectra on the left and infant spectra on the right. Odd numbers in the patient identifiers denote the mothers, even numbers denote children. Asterisks denote maternal co-infection with HIV-1. Each color represents a unique variant in longitudinal analysis but not in between-patient analysis. In the case of the TVC385-TVC386 mother-child pair (bottom panel), the variant spectrum was scaled up to highlight the actual degree of quasispecies complexity obtained as a result of NGS. B. Variant identity matrices based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of E2 (nucleotide positions 1491-1787, except in TVC189-TVC190, where nucleotide positions were 1491-1790). Negative numbers relate to gestational age in the mother (days), whereas positive numbers relate to the age of the child (days). Numbers highlighted in red relate to comparisons between mother and child. CB: Umbilical cord blood

3. Discussion

La région N-terminale de la glycoprotéine d'enveloppe E2 est la région la plus variable du VHC. Elle comprend les sites d'hypervariabilité HVR1 et 2 (positions 1491-1787 de l'isolat H77) qui, eux-mêmes, flanquent un troisième site d'hypervariabilité mis à jour par notre groupe (Figure 8) (127).

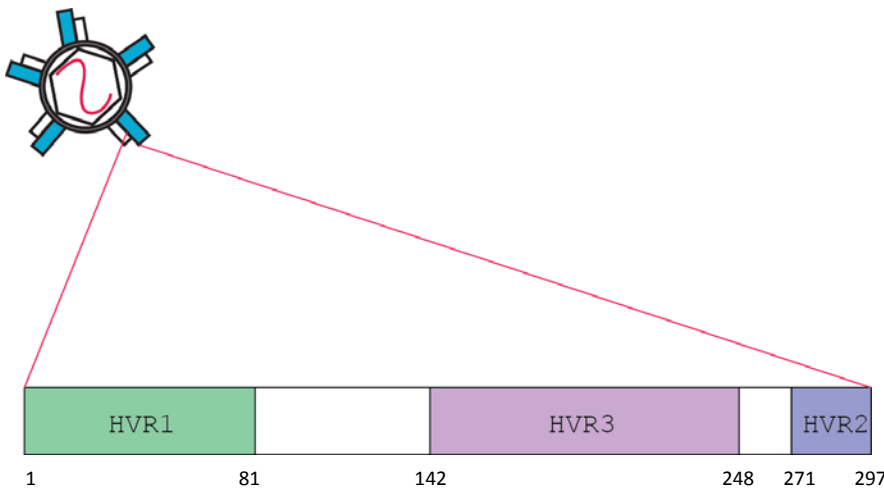


Figure 8 : Représentation schématique des régions hypervariables 1 à 2 flanquant un troisième site d'hypervariabilité mis à jour par notre équipe. Les positions nucléotidiques sont représentées par rapport au N-terminal

En raison d'une pression sélective immunitaire intense, l'essentiel de la quasispéciation du VHC se situe au niveau de ces régions hypervariables (125, 127, 142-145). Qui plus est, de nombreuses études se sont intéressées au caractère prédictif de la région HVR1, représentée par les 81 premiers nucléotides de la glycoprotéine E2, quant à l'issue clinique de l'infection (146-150). Puisque le goulot d'étranglement génétique lors de la transmission du VHC entre adultes est en très grande partie dépeint par la restriction génétique au niveau des HVRs, la compréhension de la dynamique biologique sous-jacente à la TME du VHC ainsi que ses déterminants passe par la clarification du rôle de ces domaines de variabilité.

Dans cette étude, nous nous sommes donc attardés à la région HVR1-2 de la glycoprotéine E2 en procédant à l'analyse longitudinale de la structure de la quasispèce retrouvée chez 5 paires mère-enfant, dont 3 femmes étaient également coinfectées par le VIH-1. Nous avons mis en lumière la présence d'un goulot d'étranglement passablement étroit lors de la TME du VHC lorsque la mère est seulement infectée par le VHC. Par contre, ce goulot d'étranglement devient drastiquement élargi

lorsque la mère est coinfectée par le VIH-1. Nous avons observé, dans les 3 cas où les prélèvements étaient disponibles, la présence d'un second goulot d'étranglement de 0,5-1 an d'âge chez l'enfant. Aussi, nous avons montré par analyse de l'identité génétique basée sur les régions HVR1-2 que la transmission du VHC peut prendre place aussi tôt que lors du deuxième trimestre de grossesse. Ceci constitue un témoignage inédit confirmant l'hypothèse selon laquelle la détection d'ARN viral par RT-PCR à la naissance serait la conséquence d'une transmission *in utero*. Nous avons illustré que de 0-127 jours d'âge, la dynamique d'infection chez le jeune enfant suit un patron où la charge virale augmente simultanément à une diminution de la diversité. Finalement, nous avons exposé qu'il est vraisemblable que la transmission du VHC puisse prendre place non seulement de la mère à l'enfant mais inversement, ce qui sera étayé.

3.1 Goulot d'étranglement génétique lors de la TME du VHC

Dans tous les cas présentés, la structure de la quasiespèce infantile est différente de celle retrouvée chez la mère (Figure 1 A). Il est en effet apparent que la variante majoritaire retrouvée chez la mère est différente de celle retrouvée chez l'enfant et ce dans l'ensemble des cas étudiés. En se basant sur la fréquence relative de ces variantes en fonction des temps de prélèvement, ce postulat est appuyé par la valeur de l'indice de similarité de Morisita-Horn. Cet indice est significativement plus élevé lorsque les échantillons prélevés chez la mère sont comparés entre eux que lorsque ceux impliquant la mère et son enfant sont comparés (test U de Mann-Whitney, $p = 0,0001$). Nous rapportons donc ici, pour la première fois, une preuve directe et en haute résolution de l'existence d'un goulot d'étranglement génétique lors de la TME du VHC. L'existence de ce dernier pourrait être expliquée par le passage sélectif à l'interface maternofoetale, l'établissement préférentiel ou encore le passage d'un nombre limité de certaines variantes virales. Ces résultats sont en phase avec des observations précédentes où la variante majoritaire infantile n'était pas nécessairement la même que celle retrouvée chez la mère (141, 151, 152)

3.2 De nombreuses variantes peuvent être transmises de la mère à l'enfant

Nous avons également observé que lorsque la mère était coïnfectée par le VIH-1 et le VHC, le nombre de variantes impliquées lors de la TME du VHC était plus grand ($n=111-118$) que lorsque la mère était infectée seulement par le VHC ($n=1-4$). Ceci est singulièrement différent de ce qui est observé dans le cas du VIH-1, où une seule variante transmise est la norme et non l'exception (153). Il semble plausible que l'infection au VIH-1 ait une incidence sur le nombre de variantes transmises et ceci pourrait s'expliquer par l'inflammation du tissu placentaire qui est associée à l'infection au VIH-1 durant la grossesse (68). Un tel environnement inflammatoire pourrait favoriser le passage par micro-transfusions de nombreuses particules virales. Rappelons que le VHC peut circuler chez son hôte à des charges virales de l'ordre de 10^6 particules virales / ml. Conséquemment, l'interface maternofoetale est exposée à un nombre imposant ($10^{12} - 10^{13}$) de virions lors de la gestation (71). Sachant que des cellules immunitaires transitent de la mère à l'enfant et inversement, il semble admissible que de multiples particules virales arrivent également à transiter lors d'un bris d'intégrité placentaire (67). Alternativement, il existe une population particulière de cellules immunitaires à l'interface maternofoetale. En effet, il y réside un gradient de lymphocytes natural killer-T (NKT) et $T \gamma\delta$ entre la décidua utérine et le placenta (49, 50). Or, le réservoir de cellules NKT ainsi que le répertoire des cellules $T \gamma\delta$ sont notablement affectés lors de l'infection au VIH-1 (154, 155). Une altération de la vigilance immunitaire à l'interface maternofoetale pourrait possiblement être en cause dans le passage d'un nombre important de virions lors de la coïnfection maternelle avec le VHC et le VIH-1. Dans le cas où peu de variantes sont transmises entre la mère et l'enfant en dépit d'une charge virale élevée, certaines questions demeurent : Existe-t-il une différence d'infectivité entre les variantes transmises et non transmises? Est-ce possible que le fœtus exposé au VIH mais non infecté ait une capacité immunitaire altérée permettant l'établissement d'un nombre plus important de variantes virales? Dans ce contexte, serait-ce possible que la plupart des variantes soient incapables de compléter un cycle répliatif chez le fœtus immuno-compétent? Est-ce que le système immunitaire maternel arrive normalement à contrôler la contamination des trophoblastes? Est-ce que le nombre plus grand de particules virales transmises explique l'augmentation du taux de TME du VHC observé lors de la coïnfection maternelle avec le VIH-1?

3.3 Dynamique d'établissement de l'infection au VHC chez l'enfant

Notons qu'un fort goulot d'étranglement génétique au niveau des variantes principales est observé dans l'ensemble de ces cas de TME du VHC. L'existence d'un tel changement drastique de composition de population est incompatible avec l'hypothèse que ce soit strictement le passage d'un nombre limité de virions qui en soit responsable. En effet, une telle hypothèse supposerait l'observation d'un goulot d'étranglement génétique moins important lors de la transmission de nombreuses particules virales de la mère à l'enfant. Ceci n'est pas ce qui est observé. À cet égard, nous avons remarqué que de 0-127 jours d'âge, la diversité suivait un patron inverse par rapport à l'évolution de la charge virale (Figure 3). Ainsi, lors de l'augmentation de la charge virale chez l'enfant, nos données suggèrent que c'est essentiellement la réplication préférentielle d'un nombre de variantes limité qui est responsable de l'existence d'un tel changement de prédominance d'une variante. Considérant que de nombreuses particules virales puissent passer de la mère à l'enfant, il est possible que l'expansion de la population virale par un nombre limité de particules particulièrement adaptées au nouvel hôte explique le profil observé. Il existerait donc un ou des déterminants autres que le nombre de particules virales passant l'interface maternofoetale qui seraient impliqués dans le goulot d'étranglement observé lors de TME du VHC. Ce résultat vient apporter une nuance à un récent rapport faisant état de la détection de la TME de mutants d'échappement révertants (139). Ce manuscrit fait état de la relation entre l'immunogénicité d'une variante et sa transmission mère-enfant. Il a été suggéré qu'en fait, une variante révertante (immunogène) d'un mutant d'échappement soit responsable de la TME du VHC. Or, nos données supportent plutôt une situation où la transmission de plusieurs particules virales puisse, après une sélection préférentielle, donner lieu à la réplication active d'un nombre limité de variantes en opposition avec la transmission d'une seule variante révertante. L'immunogénicité de telles variantes est une question qui demeure à étayer et n'est pas le sujet du présent rapport. Néanmoins, des expériences en ce sens sont actuellement en cours dans le laboratoire pour déterminer la capacité neutralisante du sérum maternel et/ou infantile envers des variantes ayant été transmises ou non. Ce schéma expérimental utilisera des pseudoparticules virales codant différents fragments HVRs, lesquelles seront exposées aux sérums maternels et infantiles lors de l'infection d'une lignée cellulaire d'hépatocytes humains (Figure 9) (156).

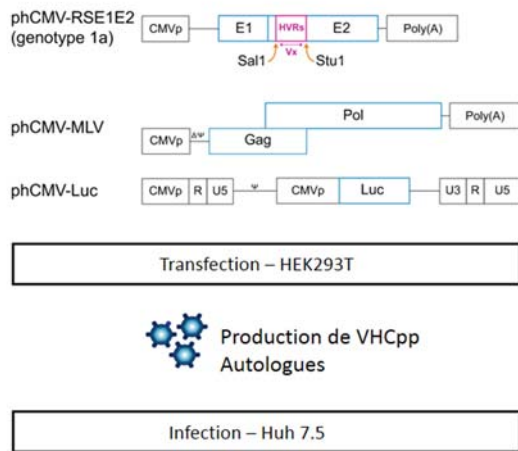


Figure 9 : Schéma expérimental de production de pseudoparticules virales. Un vecteur codant pour les glycoprotéines E1-E2 et ayant des sites de restriction flanquant les régions hypervariables est utilisé. Les régions HVR1-2 sont permuetées et des pseudoparticules sont produites. Celles-ci peuvent servir à tester l’infectivité et le pouvoir neutralisant des sérums maternels et infantiles. (156)

3.4 Un second goulot d’étranglement chez l’enfant

L’apparition à 0,5-1 an d’âge d’un second goulot d’étranglement a également été notée lorsque les échantillons étaient disponibles. Ce second goulot pourrait être en relation avec l’émergence d’une réponse immunitaire spécifique au VHC chez le jeune enfant. Il est possible que cet effet soit au moins en partie la conséquence de l’apparition d’immunoglobulines spécifiques. En effet, des travaux décrivent l’émergence d’immunoglobulines spécifiques au VHC précisément lors de cette période de l’enfance (157). À tout le moins, ce moment correspond au déclin des immunoglobulines passivement acquises chez l’enfant lors de la gestation (39, 40). Ces résultats suggèrent donc qu’un certain changement de pression de sélection, possiblement exercée par la réponse humorale, soit impliqué lors de la détection de ce second goulot d’étranglement. Ceci est d’autant plus éloquent qu’une augmentation significative des marqueurs d’inflammation hépatique AST et ALT est observée vers 1 an d’âge comparativement au premier mois de vie (Tableau 1, Test U de Mann-Whitney, $p = 0,05$). Comme la glycoprotéine E2 est exposée aux solvants et qu’elle est le site d’attachement d’un nombre important d’anticorps neutralisants et non-neutralisants, il paraît vraisemblable que l’immunité humorale puisse être impliquée dans l’évolution de la quasiespèce chez l’enfant en jeune âge. Notons cependant que dans un cas (TVC56), le goulot d’étranglement observé au niveau nucléotidique ne se répercute pas en un changement en acides aminés. Il est possible que la réponse immunitaire apparaissant avant 1 an d’âge ait été insuffisante pour induire un changement drastique dans la composition de la quasiespèce. Néanmoins, l’émergence de ce que nous pensons être une réponse immunitaire spécifique au VHC à 0,5 - 1 an d’âge pourrait représenter un moment particulièrement propice pour le début d’une

thérapie. À plus forte raison parce que de nombreux agents à action directe, approuvés ou en voie de l'être, permettent désormais de s'affranchir de l'IFN- α , le principal agent toxique pour l'enfant du traitement classique à la ribavirine et l'IFN- α .

3.5 La TME du VHC peut prendre place *in utero*

Toujours chez le couple mère-enfant TVC55-56, 31 variantes partagées entre la mère au deuxième trimestre et l'enfant mais pas retrouvée subséquemment chez la mère ont été détectées. Ceci est indicatif d'une TME précoce ayant pu prendre place aussi tôt que lors du second trimestre de gestation. Cette observation est en accord avec la détection fréquente d'acides nucléiques du VHC par RT-PCR dans les heures suivant la naissance. Également, il est fréquent que les enfants naissent avec des niveaux d'AST et ALT élevés, ce qui témoigne d'une réplication virale et de dommages hépatiques qui en sont la conséquence et qui sont antérieurs à la naissance (33). Ceci représente, au meilleur de nos connaissances, le premier témoignage d'une preuve directe de la transmission *in utero*. Cette observation a une implication directe pour la stratégie thérapeutique. En effet, dans ce contexte, il ne serait pas envisageable de procéder à une intervention préventive *peripartum* comme dans le cas VIH-1. Qui plus est, la détection d'une TME précoce du VHC n'est pas nécessairement exclusive d'une TME tardive. En effet, il est possible que la TME du VHC soit un processus qui prend place à plusieurs moments lors de la gestation, ce qui a également des implications quant au moment adéquat d'une intervention préventive.

3.6 Radiation génétique lors de la TME du VHC

L'analyse de la phylogénie des quasiespèces maternelles par rapport à celles retrouvées chez leur enfant montre un certain chevauchement entre l'espace génétique occupé par celle de la mère et celle de l'enfant. Les quasiespèces observées sont la plupart du temps complexes mais distinctes. Néanmoins, localement, il semblerait que les variantes radient dans un espace génétique qui soit raisonnablement restreint (Supplementals 2 et 3). Nous avons noté que, bien que ce ne soit pas systématique, le centre de radiation génétique est fréquemment issu d'une variante partagée entre la mère et l'enfant. Cette variante partagée peut générer des variantes soit maternelles où soit infantiles.

3.7 Transmission du VHC de l'enfant à la mère

Finalement, il semblerait possible que la transmission du VHC prenne place non seulement de la mère à l'enfant mais aussi de l'enfant à la mère (Figure 2). L'haplotype H502, retrouvé à 13, 27 et 385 jours chez l'enfant TVC56 semble générer une grappe de variantes maternelles chez TVC55. H502 est une variante minoritaire (<1%) issue de la radiation de variantes infantiles et sa descendance génétique est strictement retrouvée chez la mère en fin de grossesse, de 23 jours à 1 jour avant l'accouchement. Le traitement, notamment l'amplification par RT-PCR, des échantillons maternels et infantiles a non seulement été effectué de façon strictement parallèle mais ces résultats ont été retrouvés au cours de deux rondes de séquençage distinctes. Nous excluons donc la possibilité d'une contamination. Cet aspect de la TME du VHC n'a à notre connaissance jamais été mentionné dans la littérature et pose un regard nouveau sur la transmission. En effet, cette situation impliquerait que non seulement les déterminants infantiles régissant la transmission soient de première importance mais que le contrôle de la transmission enfant-mère de nouvelles variantes puisse jouer un certain rôle dans la TME du VHC. La grossesse étant une période complexe au niveau immunitaire, le transfert enfant-mère de virions a le potentiel d'avoir un impact sur la pathogénèse induite par le VHC chez la femme enceinte.

3.8 Difficultés rencontrées

Cette étude a la particularité éthique et technique de porter sur des femmes enceintes et des sujets pédiatriques. La constance du suivi clinique dans la population étudiée est parfois laborieuse à maintenir (Supplemental 1). Certains de ces patients ont une prise de thérapie erratique ainsi qu'un suivi médical parcellaire. L'obtention régulière d'échantillons pour la recherche représente donc un certain défi. Qui plus est, le volume des échantillons pédiatriques est limitant de par leur origine. Notons également que le faible taux de TME du VHC en concomitance avec une population nord-américaine faiblement touchée rendent le recrutement de sujets ardu.

L'établissement d'une méthode d'amplification par RT-PCR d'une région hypervariable pose un défi technique nécessitant la conception stratégique d'amorces. Nous avons ciblé des régions flanquantes des HVRs et qui sont suffisamment conservées (Supplemental 4). De nombreux essais et erreurs ont eu lieu et il est possible que la structure secondaire de l'ARN génomique du VHC ait été la cause au moins

en partie des difficultés que nous ayons rencontrées au niveau de l'amplification. En effet, il est arrivé, lors de l'analyse bioinformatique, de détecter des « sauts » dans les séquences, c'est-à-dire une région omise située entre deux régions flanquantes séquencées. Ces séquences ont été traitées comme des artéfacts et par conséquent éliminées de toute analyse ultérieure. Il est probable que ces sauts témoignent de structures secondaires particulières à certains génotypes voire variantes lesquelles ont permis un saut de section de la polymérase au niveau du brin matrice. Afin d'obtenir des amplifications davantage fiables, nous avons donc procédé à une amplification nichée en 2 rondes, la première ronde usant d'amorces externes permettant l'amplification subséquente de la région d'intérêt.

Les amorces nécessaires au pyroséquençage contiennent un adaptateur, une séquence code-barres et un signal de lecture. Nous avons donc contrôlé l'éventualité d'un biais d'amorce/technique en séquençant par technique traditionnelle de clonage TOPO TA suivi d'un séquençage de Sanger la région HVR1-2 chez la patiente TVC79 et son enfant TVC80, et ce en utilisant différentes paires d'amorces. Cet exercice a permis de valider la technique et poursuivre en aval l'expérimentation.

L'analyse bioinformatique des données récoltées par séquençage de nouvelle génération a sans doute été le défi le plus important de cet exercice expérimental. En effet, le pyroséquençage est connu pour générer de nombreuses erreurs dans les régions homopolymériques (158). C'est un biais de technique qui a été contourné par certains par l'élaboration d'algorithmes de correction mais notre expérience tend à démontrer que ceux-ci sont peu sensibles pour les analyses d'identité génétique (159-161). Qui plus est, la correction homopolymérique tend à générer des erreurs systématiques, *a fortiori* si l'erreur de séquençage se retrouve à de nombreuses reprises dans le fichier brut. À cet effet, nous avons élaboré un protocole de traitement des données semi-manuel qui permet d'éviter la modification des séquences récoltées mais qui a le désavantage d'être onéreux en temps. (Annexe 2, B). En résultante, 94, 932 séquences ont été manuellement triées pour une moyenne de 4520,48 séquences / échantillon. Considérant un fragment d'une longueur de 297 nucléotides, ce sont 28 194 804 bases qui ont été analysées.

Il est vrai qu'alternativement, nous aurions pu faire le choix d'utiliser l'un des algorithmes de correction développés au cours des dernières années. En réponse aux erreurs typiques du pyroséquençage, les algorithmes apparus précocement s'articulaient surtout autour de la séquestration des séquences à l'intérieur d'unités taxonomiques (*clusters*) dont l'utilisateur fixe le taux de similarité entre les séquences (162). Cette approche était surtout adéquate pour l'étude de biotes dont les séquences

nucléotidiques étudiées sont largement moins variables que celles qu'on peut retrouver chez les virus. Cet angle d'approche n'est pas approprié pour l'étude de virions dont les propriétés uniques des différentes variantes revêtent un certain intérêt. Ultérieurement, des algorithmes de correction des séquences ont été générés. Entre autres, Quince *et al.* ont développé AmpliconNoise, un script de correction des données brutes du pyroséquençage (correction des données de lecture des intensités lumineuses) (163). Cependant, ce type d'algorithmes se base de façon erronée sur la prémisse que la dispersion des erreurs suit une distribution de Poisson ou binomiale (158, 164, 165). En effet, comme mentionné précédemment, les erreurs de séquençages ont tendance à être séquence-spécifiques et focalisées au niveau des homopolymères. Afin de remédier à cet aspect de la correction des séquences, Skums *et al.* ont développé un algorithme qui identifie les régions dont le séquençage semble problématique en subdivisant la séquence en K-mer et en comparant ceux-ci entre eux (161). Bien que les algorithmes de correction aient évolués de façon importante et que la correction appliquée par ce dernier nous semble supérieure pour les régions hypervariables de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC, une correction manuelle demeure nécessaire pour éliminer les erreurs systématiques du programme (résultats non montrés). Finalement, alors que nous avons déjà entamé le traitement des données générées ainsi qu'investi un nombre important d'heures dans l'analyse du présent ensemble de données, est apparu l'algorithme CorQ qui se base essentiellement sur la qualité de lecture en fonction des propriétés de la séquence. C'est un algorithme qui intègre la qualité du score de détermination des bases nucléotidiques et qui corrige les insertions/délétions homopolymériques ou non (166). Nous n'avons malheureusement pas pu tester cet algorithme. Malgré l'existence de ces programmes informatiques, nous avons préféré l'élimination des erreurs détectées plutôt que l'altération algorithmique des données qui, dans nos mains, s'est avérée générer de nombreuses erreurs systématiques. En plus de ces erreurs, nous avons remarqué une certaine propension aux faux négatifs, ce qui résulte en une perte importante de résolution.

Le volume de données a également posé problème pour certaines analyses. Le séquençage de dernière génération est en effet générateur de plus de données qu'il n'est actuellement possible de traiter dans un délai raisonnable. Un échantillonnage aléatoire a donc été nécessaire pour compléter certaines analyses plus exigeantes (p -distance, ratio DN/DS, etc.). Malgré tout, le séquençage de nouvelle génération représente un avantage majeur au niveau de la sensibilité de détection des variantes minoritaires. Non seulement l'étude des variantes minoritaire est essentielle car ces variantes occupent une position clé de voute dans les changements de pression de sélection (nouvel hôte, transplantation,

changement de thérapie, etc.), mais le séquençage de nouvelle génération permet de capturer l'essentiel de la diversité présente dans un échantillon. Il a été possible de contrôler l'aspect de couverture de la diversité présente par des analyses de raréfaction (non montré) et nous avons réalisé que >1000 séquences sont nécessaires dans la plupart des cas pour capturer l'essentiel de la quasiespèce. C'est une des raisons qui justifient l'utilisation du séquençage de nouvelle génération en opposition au clonage séquençage traditionnels où pour obtenir de tels résultats, les délais, le coût et les considérations techniques ne sont pas envisageables. En dépit de ses désavantages, le pyroséquençage a été préféré à la technique Illumina Genome analyzer (ABI, SOLiD) puisqu'au moment des expériences, la longueur des lectures ne permettait pas une couverture complète des régions HVR1-2 (167).

Le design du projet sur la TME du VHC fait partie d'un plus grand effort de monitoring des marqueurs virémiques et immunitaires durant la grossesse et chez le jeune enfant. En ce sens, le choix de séquencer la région HVR1-2, une région qui a été démontrée comme cruciale dans la réponse immunitaire humorale et cellulaire (voir plus haut), est approprié. Cependant, et même si cette région est la plus variable du génome viral, il est nécessaire de mentionner qu'il existe une certaine diversité génétique n'ayant pas été capturée au niveau des autres régions, notamment en ce qui a trait aux gènes NS5A et NS5B (168). C'est une des limitations de la présente analyse, et les techniques ayant évolué depuis le début de ces travaux, un séquençage du génome complet serait désormais envisageable pour confirmer les résultats présentés (138). Comme brièvement mentionné précédemment, des travaux sont en cours afin de clarifier la signification clinique de la transmission et l'établissement préférentiel de certaines variantes. L'immunogénicité des variantes virales de la région HVR1-2 retrouvées chez la mère et son enfant sera testée, notamment en ce qui a trait à la capacité neutralisante des Ac retrouvés dans les sérums maternels et infantiles et au déclenchement de la cytotoxicité dépendante des anticorps en présence de la glycoprotéine d'enveloppe. Ceci fera l'objet d'études subséquentes.

Conclusion

Pour conclure, nous avons étudié la TME du VHC sous l'angle de la phylogénétique virale, un sujet qui demeure sous-documenté. La clarification de la dynamique de passage du VHC de la mère à l'enfant est essentielle à l'élaboration d'éventuels modes de prévention.

En ce sens, nous avons confirmé avec précision l'existence d'un goulot d'étranglement génétique lors de la TME du VHC. Bien que de nombreuses particules virales puissent passer de la mère à l'enfant - ce qui est particulièrement vrai lorsque la mère est coïnfectée avec le VHC et le VIH-1 - nous avons démontré que l'essentiel de répllication virale chez l'enfant est orchestrée par très peu voire une seule variante principale. Cette dynamique d'infection soulève l'hypothèse selon laquelle il existerait un ou des déterminants responsables de l'existence d'un goulot d'étranglement autres que le nombre limité de particules virales transmises.

De 0,5 à 1 an âge, nous avons observé un changement de pression de sélection se répercutant en une commutation de la structure de la quasiespèce retrouvée chez l'enfant. Sachant que c'est le moment où l'immunité humorale infantile prend de l'ampleur, en concomitance avec le déclin des immunoglobulines maternelles passivement acquises, nous confirmons l'importance de l'immunité humorale dans le processus du goulot d'étranglement génétique, à tout le moins au niveau de la glycoprotéine E2. Aussi, nous identifions un moment où il serait propice d'intervenir thérapeutiquement afin de maximiser les chances de réponse antivirale soutenue.

La détection d'un cas de transmission *in utero* a également une implication clinique. En effet, dans l'éventualité de l'élaboration d'une stratégie préventive de la TME du VHC, il s'avèrerait primordial d'envisager un traitement précoce. La TME du VHC a le potentiel de favoriser l'immunotolérance infantile, ce qui reste à démontrer.

Finalement, nous avons eu la chance de décrire pour la première fois une dynamique de transmission enfant-mère, ce qui constitue un résultat tout à fait inattendu. Ce passage pourrait avoir une implication dans la pathogénèse induite par le VHC durant la grossesse et cette observation appelle à la confirmation par d'autres techniques expérimentales contemporaines comme le séquençage complet du génome (*single genome sequencing*). En somme, nous avons clarifié certains aspects phylogénétiques de la TME du VHC mais un travail important reste à achever concernant les déterminants immunologiques de celle-ci et ainsi permettre l'élaboration d'une stratégie préventive.

Bibliographie

1. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(2):107-15.
2. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(9):558-67.
3. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2009;29 Suppl 1:74-81.
4. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57(4):1333-42.
5. S Remis R. Modelling the incidence and prevalence of hepatitis C infection and its sequelae in Canada, 2007. Report. Agence de la santé publique du Canada, 2007.
6. Southern WN, Drainoni ML, Smith BD, Christiansen CL, McKee D, Gifford AL, et al. Hepatitis C testing practices and prevalence in a high-risk urban ambulatory care setting. *Journal of viral hepatitis*. 2011;18(7):474-81.
7. Koretz RL, Abbey H, Coleman E, Gitnick G. Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. Looking back in the second decade. *Annals of internal medicine*. 1993;119(2):110-5.
8. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S93-8.
9. Thorpe LE, Ouellet LJ, Hershov R, Bailey SL, Williams IT, Williamson J, et al. Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *American journal of epidemiology*. 2002;155(7):645-53.
10. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Lyles CM, Cohn S, Thomas DL. Incidence and risk factors for hepatitis C among injection drug users in Baltimore, Maryland. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(12):3274-7.
11. Hagan H, Thiede H, Weiss NS, Hopkins SG, Duchin JS, Alexander ER. Sharing of drug preparation equipment as a risk factor for hepatitis C. *American journal of public health*. 2001;91(1):42-6.
12. Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE, Jr., Yawn DH, McAllister HA, Jr., et al. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*. 1992;327(6):369-73.
13. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13(17):2436-41.
14. Scheiblaue H, El-Nageh M, Nick S, Fields H, Prince A, Diaz S. Evaluation of the performance of 44 assays used in countries with limited resources for the detection of antibodies to hepatitis C virus. *Transfusion*. 2006;46(5):708-18.
15. Hladik W, Kataaha P, Mermin J, Purdy M, Otekat G, Lackritz E, et al. Prevalence and screening costs of hepatitis C virus among Ugandan blood donors. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2006;11(6):951-4.
16. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997;26(3 Suppl 1):62S-5S.
17. Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology*. 2013;57(3):881-9.
18. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *The Journal of infectious diseases*. 1995;171(4):768-75.

19. Schmidt AJ, Rockstroh JK, Vogel M, An der Heiden M, Baillot A, Krznaric I, et al. Trouble with bleeding: risk factors for acute hepatitis C among HIV-positive gay men from Germany--a case-control study. *PloS one*. 2011;6(3):e17781.
20. Castello G, Scala S, Palmieri G, Curley SA, Izzo F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clinical immunology*. 2010;134(3):237-50.
21. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(9):553-62.
22. Thaler MM, Park CK, Landers DV, Wara DW, Houghton M, Veereman-Wauters G, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet*. 1991;338(8758):17-8.
23. Le Champion A, Larouche A, Fauteux-Daniel S, Soudeyns H. Pathogenesis of hepatitis C during pregnancy and childhood. *Viruses*. 2012;4(12):3531-50.
24. European Paediatric Hepatitis CVN. A significant sex--but not elective cesarean section--effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(11):1872-9.
25. De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, Hoff E, et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2000;283(9):1175-82.
26. Afridi SQ, Ali MM, Awan F, Zahid MN, Afridi IQ, Afridi SQ, et al. Molecular epidemiology and viral load of HCV in different regions of Punjab, Pakistan. *Virology journal*. 2014;11:24.
27. Pembrey L, Newell ML, Tovo PA, Collaborators E. The management of HCV infected pregnant women and their children European paediatric HCV network. *Journal of hepatology*. 2005;43(3):515-25.
28. Jara P, Resti M, Hierro L, Giacchino R, Barbera C, Zancan L, et al. Chronic hepatitis C virus infection in childhood: clinical patterns and evolution in 224 white children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003;36(3):275-80.
29. Bortolotti F, Verucchi G, Camma C, Cabibbo G, Zancan L, Indolfi G, et al. Long-term course of chronic hepatitis C in children: from viral clearance to end-stage liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134(7):1900-7.
30. Jhaveri R, Grant W, Kauf TL, McHutchison J. The burden of hepatitis C virus infection in children: estimated direct medical costs over a 10-year period. *The Journal of pediatrics*. 2006;148(3):353-8.
31. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *The New England journal of medicine*. 1992;327(27):1899-905.
32. Mohan P, Barton BA, Narkewicz MR, Molleston JP, Gonzalez-Peralta RP, Rosenthal P, et al. Evaluating progression of liver disease from repeat liver biopsies in children with chronic hepatitis C: a retrospective study. *Hepatology*. 2013;58(5):1580-6.
33. Agha S, Sherif LS, Allam MA, Fawzy M. Transplacental transmission of hepatitis C virus in HIV-negative mothers. *Research in virology*. 1998;149(4):229-34.
34. Tovo PA, Pembrey LJ, Newell ML. Persistence rate and progression of vertically acquired hepatitis C infection. *European Paediatric Hepatitis C Virus Infection. The Journal of infectious diseases*. 2000;181(2):419-24.
35. Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR. Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*. 2007;4(11):622-34.
36. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(4):829-41.

37. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, et al. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *European journal of immunology*. 2000;30(9):2479-87.
38. Dauby N, Goetghebuer T, Kollmann TR, Levy J, Marchant A. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *The Lancet infectious diseases*. 2012;12(4):330-40.
39. Ferrero S, Lungaro P, Bruzzone BM, Gotta C, Bentivoglio G, Ragni N. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10-year survey (1990-2000). *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2003;82(3):229-34.
40. Manzini P, Saracco G, Cerchier A, Riva C, Musso A, Ricotti E, et al. Human immunodeficiency virus infection as risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission; persistence of anti-hepatitis C virus in children is associated with the mother's anti-hepatitis C virus immunoblotting pattern. *Hepatology*. 1995;21(2):328-32.
41. Resti M, Azzari C, Mannelli F, Moriondo M, Novembre E, de Martino M, et al. Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. *Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection*. *Bmj*. 1998;317(7156):437-41.
42. Indolfi G, Resti M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *Journal of medical virology*. 2009;81(5):836-43.
43. Mok J, Pembrey L, Tovo PA, Newell ML, European Paediatric Hepatitis CVN. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 2005;90(2):F156-60.
44. Delamare C, Carbonne B, Heim N, Berkane N, Petit JC, Uzan S, et al. Detection of hepatitis C virus RNA (HCV RNA) in amniotic fluid: a prospective study. *Journal of hepatology*. 1999;31(3):416-20.
45. Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S106-13.
46. Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(4):1016-25.
47. Fuchs R, Ellinger I. Endocytic and transcytotic processes in villous syncytiotrophoblast: role in nutrient transport to the human fetus. *Traffic*. 2004;5(10):725-38.
48. Peirera L, Maidji E, McDonagh S, Tabata T. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends in Microbiology*. 2005;13(14):164-74.
49. Hurtado CW, Golden-Mason L, Brocato M, Krull M, Narkewicz MR, Rosen HR. Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C--seropositive mother-infant dyads. *PloS one*. 2010;5(8):e12232.
50. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *American journal of reproductive immunology*. 2010;63(6):425-33.
51. Pelletier S, Drouin C, Bedard N, Khakoo SI, Bruneau J, Shoukry NH. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *Journal of hepatology*. 2010;53(5):805-16.
52. Alter G, Jost S, Rihn S, Reyor LL, Nolan BE, Ghebremichael M, et al. Reduced frequencies of NKp30+ NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *Journal of hepatology*. 2011;55(2):278-88.
53. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-9.
54. Munz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(2):203-7.

55. Lagaye S, Derrien M, Menu E, Coito C, Tresoldi E, Mauclere P, et al. Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *Journal of virology*. 2001;75(10):4780-91.
56. Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L. Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *The American journal of pathology*. 2006;168(4):1210-26.
57. Bhat P, Anderson DA. Hepatitis B virus translocates across a trophoblastic barrier. *Journal of virology*. 2007;81(13):7200-7.
58. Nie QH, Gao LH, Cheng YQ, Huang XF, Zhang YF, Luo XD, et al. Hepatitis C virus infection of human cytotrophoblasts cultured in vitro. *Journal of medical virology*. 2012;84(10):1586-92.
59. Atay S, Gercel-Taylor C, Kesimer M, Taylor DD. Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Experimental cell research*. 2011;317(8):1192-202.
60. Ethier-Chiasson M, Duchesne A, Forest JC, Giguere Y, Masse A, Mounier C, et al. Influence of maternal lipid profile on placental protein expression of LDLr and SR-BI. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;359(1):8-14.
61. Dye JF, Jablenska R, Donnelly JL, Lawrence L, Leach L, Clark P, et al. Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta*. 2001;22(1):32-43.
62. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(9):715-25.
63. Dal Molin G, D'Agaro P, Ansaldi F, Ciana G, Fertz C, Alberico S, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. *Journal of medical virology*. 2002;67(2):137-42.
64. Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Betti L, Gambineri E, de Martino M, et al. Higher risk of hepatitis C virus perinatal transmission from drug user mothers is mediated by peripheral blood mononuclear cell infection. *Journal of medical virology*. 2008;80(1):65-71.
65. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *The New England journal of medicine*. 1989;321(22):1494-500.
66. Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected persons. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(2):258-65.
67. Gammill HS, Nelson JL. Naturally acquired microchimerism. *The International journal of developmental biology*. 2010;54(2-3):531-43.
68. Bhoopat L, Khunamornpong S, Sirivatanapa P, Rithaporn T, Lerdsrimongkol P, Thorner PS, et al. Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(10):1357-64.
69. Ryder RW, Nsa W, Hassig SE, Behets F, Rayfield M, Ekungola B, et al. Perinatal transmission of the human immunodeficiency virus type 1 to infants of seropositive women in Zaire. *The New England journal of medicine*. 1989;320(25):1637-42.
70. St Louis ME, Kamenga M, Brown C, Nelson AM, Manzila T, Batter V, et al. Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1993;269(22):2853-9.
71. Babik JM, Cohan D, Monto A, Hartigan-O'Connor DJ, McCune JM. The human fetal immune response to hepatitis C virus exposure in utero. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(2):196-206.

72. Cote P, Baril JG, Hebert MN, Klein M, Lalonde R, Poliquin M, et al. Management and treatment of hepatitis C virus in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection: A practical guide for health care professionals. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale / AMMI Canada*. 2007;18(5):293-303.
73. Clapham PR, McKnight A. HIV-1 receptors and cell tropism. *British medical bulletin*. 2001;58:43-59.
74. Tovo PA, Palomba E, Ferraris G, Principi N, Ruga E, Dallacasa P, et al. Increased risk of maternal-infant hepatitis C virus transmission for women coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. Italian Study Group for HCV Infection in Children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1997;25(5):1121-4.
75. Polis CB, Shah SN, Johnson KE, Gupta A. Impact of maternal HIV coinfection on the vertical transmission of hepatitis C virus: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(8):1123-31.
76. Thomas DL, Villano SA, Riestler KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH, et al. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. *Women and Infants Transmission Study*. *The Journal of infectious diseases*. 1998;177(6):1480-8.
77. Initial treatment of HCV infection in patients starting treatment [En ligne]. American Association for the Study of Liver Diseases; 2014 [modifié le 23 mars; cité le 26 avril 2014]. Disponible: <http://hcvguidelines.org/full-report/initial-treatment-hcv-infection-patients-starting-treatment>
78. DeLemos AS, Chung RT. Hepatitis C treatment: an incipient therapeutic revolution. *Trends in molecular medicine*. 2014.
79. Sleijfer S, Bannink M, Van Gool AR, Kruit WH, Stoter G. Side effects of interferon-alpha therapy. *Pharmacy world & science : PWS*. 2005;27(6):423-31.
80. Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*. 2006;55(9):1350-9.
81. Dugum M, O'Shea R. Hepatitis C virus: here comes all-oral treatment. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 2014;81(3):159-72.
82. Drug and Health products - Summary Basis of Decision (SBD) for ^{Pr}INCIVEK™. Health Canada - Santé Canada 2012.
83. Summary Basis of Decision (SBD) for ^{Pr}VICTRELIS™. Health Canada - Santé Canada. 2011.
84. Summary Basis of Decision (SBD) ^{Pr}SOVALDI. Health Canada - Santé Canada. 2014.
85. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature medicine*. 2013;19(7):837-49.
86. Liang TJ, Ghany MG. Therapy of hepatitis C--back to the future. *The New England journal of medicine*. 2014;370(21):2043-7.
87. Monographie de produit ^{Pr}PEGETRON® - ribavirine et interféron alfa-2b péguylé [En ligne]. Merck Canada inc.; 2013. Disponible: http://www.merck.ca/assets/fr/pdf/products/Pegetron-PM_F.pdf
88. Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;369:1-15.
89. Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(28):11608-13.
90. Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henriquez JA, Mishra N, et al. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *Journal of virology*. 2012;86(11):6171-8.

91. Kapoor A, Simmonds P, Scheel TK, Hjelle B, Cullen JM, Burbelo PD, et al. Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *mBio*. 2013;4(2):e00216-13.
92. Quan PL, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ, et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(20):8194-9.
93. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000;355(9207):887-91.
94. King AM, Adams MJ, Lefkowitz EJ, Carstens EB. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Elsevier; 2012.
95. Lindenbach BD, H.-J. Thiel, C.M. Rice. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. Dans: al. DKe, rédacteur. *Fields Virology*. 5th éd. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1101-33.
96. Shetty S, Stefanovic S, Mihailescu MR. Hepatitis C virus RNA: molecular switches mediated by long-range RNA-RNA interactions? *Nucleic acids research*. 2013;41(4):2526-40.
97. You S, Rice CM. 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *Journal of virology*. 2008;82(1):184-95.
98. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of virology*. 2001;75(24):12047-57.
99. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Medical microbiology and immunology*. 1992;181(5):293-300.
100. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of virology*. 2002;76(14):6919-28.
101. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;369:87-112.
102. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, et al. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(43):41624-30.
103. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(7):482-96.
104. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(6):453-63.
105. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *The Journal of general virology*. 2000;81(Pt 7):1631-48.
106. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology*. 2006;80(4):1734-41.
107. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of virology*. 1992;66(3):1476-83.
108. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of virology*. 1993;67(3):1385-95.
109. Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends in cell biology*. 2002;12(11):517-23.
110. Quinkert D, Bartenschlager R, Lohmann V. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *Journal of virology*. 2005;79(21):13594-605.
111. Cuevas JM, Gonzalez-Candelas F, Moya A, Sanjuan R. Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *Journal of virology*. 2009;83(11):5760-4.

112. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-27.
113. Eigen M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Die Naturwissenschaften*. 1971;58(10):465-523.
114. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS pathogens*. 2010;6(7):e1001005.
115. Campo DS, Dimitrova Z, Yokosawa J, Hoang D, Perez NO, Ramachandran S, et al. Hepatitis C virus antigenic convergence. *Scientific reports*. 2012;2:267.
116. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2012;76(2):159-216.
117. Lauring AS, Frydman J, Andino R. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(5):327-36.
118. Pomerantz RJ. Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;34(1):91-7.
119. Smit TK, Brew BJ, Tourtellotte W, Morgello S, Gelman BB, Saksena NK. Independent evolution of human immunodeficiency virus (HIV) drug resistance mutations in diverse areas of the brain in HIV-infected patients, with and without dementia, on antiretroviral treatment. *Journal of virology*. 2004;78(18):10133-48.
120. Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annual review of biochemistry*. 2010;79:321-49.
121. Taylor DR, Puig M, Darnell ME, Mihalik K, Feinstone SM. New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *Journal of virology*. 2005;79(10):6291-8.
122. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. 1998;282(5386):103-7.
123. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of virology*. 1992;66(5):3225-9.
124. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Seminars in liver disease*. 2000;20(1):103-26.
125. Kato N, Ootsuyama Y, Tanaka T, Nakagawa M, Nakazawa T, Muraio K, et al. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus research*. 1992;22(2):107-23.
126. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, et al. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology*. 1991;180(2):842-8.
127. Troesch M, Meunier I, Lapierre P, Lapointe N, Alvarez F, Boucher M, et al. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology*. 2006;352(2):357-67.
128. Perrière G, Brochier-Armanet C. *Concepts et méthodes en phylogénie moléculaire*: Springer; 2010.
129. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*. 1981;17(6):368-76.
130. Kimura M. Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature*. 1977;267(5608):275-6.
131. Beisel J-N, Moreteau J-C. A simple formula for calculating the lower limit of Shannon's diversity index. *Ecological Modelling*. 1997;99(2-3):289-92.

132. Horn H. Measurement of "Overlap" in Comparative Ecological Studies. *The American Naturalist*. 1966;100(914):419-24.
133. Bull RA, Luciani F, McElroy K, Gaudieri S, Pham ST, Chopra A, et al. Sequential bottlenecks drive viral evolution in early acute hepatitis C virus infection. *PLoS pathogens*. 2011;7(9):e1002243.
134. Wang GP, Sherrill-Mix SA, Chang KM, Quince C, Bushman FD. Hepatitis C virus transmission bottlenecks analyzed by deep sequencing. *Journal of virology*. 2010;84(12):6218-28.
135. Quer J, Esteban JI, Cos J, Sauleda S, Ocana L, Martell M, et al. Effect of bottlenecking on evolution of the nonstructural protein 3 gene of hepatitis C virus during sexually transmitted acute resolving infection. *Journal of virology*. 2005;79(24):15131-41.
136. Liu CH, Chen BF, Chen SC, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Selective transmission of hepatitis C virus quasi species through a needlestick accident in acute resolving hepatitis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;42(9):1254-9.
137. Brown RJ, Hudson N, Wilson G, Rehman SU, Jabbari S, Hu K, et al. Hepatitis C virus envelope glycoprotein fitness defines virus population composition following transmission to a new host. *Journal of virology*. 2012;86(22):11956-66.
138. Li H, Stoddard MB, Wang S, Blair LM, Giorgi EE, Parrish EH, et al. Elucidation of hepatitis C virus transmission and early diversification by single genome sequencing. *PLoS pathogens*. 2012;8(8):e1002880.
139. Honegger JR, Kim S, Price AA, Kohout JA, McKnight KL, Prasad MR, et al. Loss of immune escape mutations during persistent HCV infection in pregnancy enhances replication of vertically transmitted viruses. *Nature medicine*. 2013;19(11):1529-33.
140. Roy A, Wang C, Li C, Lu L, Torbenson M, Hagedorn CH, et al. Phenotypic and genotypic differences between a child with vertically acquired severe hepatitis C liver disease and his mother. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2012;54(4):567-9.
141. Kudo T, Yanase Y, Ohshiro M, Yamamoto M, Morita M, Shibata M, et al. Analysis of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: quasispecies nature and buoyant densities of maternal virus populations. *Journal of medical virology*. 1997;51(3):225-30.
142. Hanada K, Tanaka Y, Mizokami M, Gojobori T, Alter HJ. A reduction in selective immune pressure during the course of chronic hepatitis C correlates with diminished biochemical evidence of hepatic inflammation. *Virology*. 2007;361(1):27-33.
143. Chambers TJ, Fan X, Droll DA, Hembrador E, Slater T, Nickells MW, et al. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *Journal of virology*. 2005;79(5):3071-83.
144. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(8):3468-72.
145. Shirai M, Arichi T, Chen M, Masaki T, Nishioka M, Ikeda K, et al. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *Journal of immunology*. 1999;162(1):568-76.
146. Cortes KC, Zagordi O, Perlejewski K, Laskus T, Maroszek K, Bukowska-Osko I, et al. Deep sequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 reveals no correlation between genetic heterogeneity and antiviral treatment outcome. *BMC infectious diseases*. 2014;14:389.
147. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. 2000;288(5464):339-44.

148. Caraballo Cortes K, Laskus T, Bukowska-Osko I, Pawelczyk A, Berak H, Horban A, et al. Variability of hepatitis C virus hypervariable region 1 (HVR-1) during the early phase of pegylated interferon and ribavirin therapy. *Advances in medical sciences*. 2012;57(2):370-4.
149. Polyak SJ, McArdle S, Liu SL, Sullivan DG, Chung M, Hofgartner WT, et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *Journal of virology*. 1998;72(5):4288-96.
150. Akram M, Idrees M, Hussain A, Afzal S, Ilyas M, Zafar S, et al. Characterization of hepatitis C Virus genotype 3a hypervariable region 1 in patients achieved rapid virological response to alpha interferon and ribavirin combination therapy. *Virology journal*. 2011;8:253.
151. Weiner AJ, Thaler MM, Crawford K, Ching K, Kansopon J, Chien DY, et al. A unique, predominant hepatitis C virus variant found in an infant born to a mother with multiple variants. *Journal of virology*. 1993;67(7):4365-8.
152. Sitia G, Cella D, De Mitri MS, Novati R, Foppa CU, Perackis K, et al. Evolution of the E2 region of hepatitis C virus in an infant infected by mother-to-infant transmission. *Journal of medical virology*. 2001;64(4):476-81.
153. Russell ES, Kwiek JJ, Keys J, Barton K, Mwapasa V, Montefiori DC, et al. The genetic bottleneck in vertical transmission of subtype C HIV-1 is not driven by selection of especially neutralization-resistant virus from the maternal viral population. *Journal of virology*. 2011;85(16):8253-62.
154. Fernandez CS, Kelleher AD, Finlayson R, Godfrey DI, Kent SJ. NKT cell depletion in humans during early HIV infection. *Immunology and cell biology*. 2014;92(7):578-90.
155. Agrati C, D'Offizi G, Gougeon ML, Malkovsky M, Sacchi A, Casetti R, et al. Innate gamma/delta T-cells during HIV infection: Terra relatively Incognita in novel vaccination strategies? *AIDS reviews*. 2011;13(1):3-12.
156. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(5):633-42.
157. Granovsky MO, Minkoff HL, Tess BH, Waters D, Hatzakis A, Devoid DE, et al. Hepatitis C virus infection in the mothers and infants cohort study. *Pediatrics*. 1998;102(2 Pt 1):355-9.
158. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80.
159. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010;7(5):335-6.
160. Zagordi O, Bhattacharya A, Eriksson N, Beerenwinkel N. ShoRAH: estimating the genetic diversity of a mixed sample from next-generation sequencing data. *BMC bioinformatics*. 2011;12:119.
161. Skums P, Dimitrova Z, Campo DS, Vaughan G, Rossi L, Forbi JC, et al. Efficient error correction for next-generation sequencing of viral amplicons. *BMC bioinformatics*. 2012;13 Suppl 10:S6.
162. Bakker MG, Tu ZJ, Bradeen JM, Kinkel LL. Implications of pyrosequencing error correction for biological data interpretation. *PloS one*. 2012;7(8):e44357.
163. Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC bioinformatics*. 2011;12:38.
164. Gilles A, Meglec E, Pech N, Ferreira S, Malausa T, Martin JF. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC genomics*. 2011;12:245.
165. Brockman W, Alvarez P, Young S, Garber M, Giannoukos G, Lee WL, et al. Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Genome research*. 2008;18(5):763-70.
166. Iyer S, Bouzek H, Deng W, Larsen B, Casey E, Mullins JI. Quality score based identification and correction of pyrosequencing errors. *PloS one*. 2013;8(9):e73015.

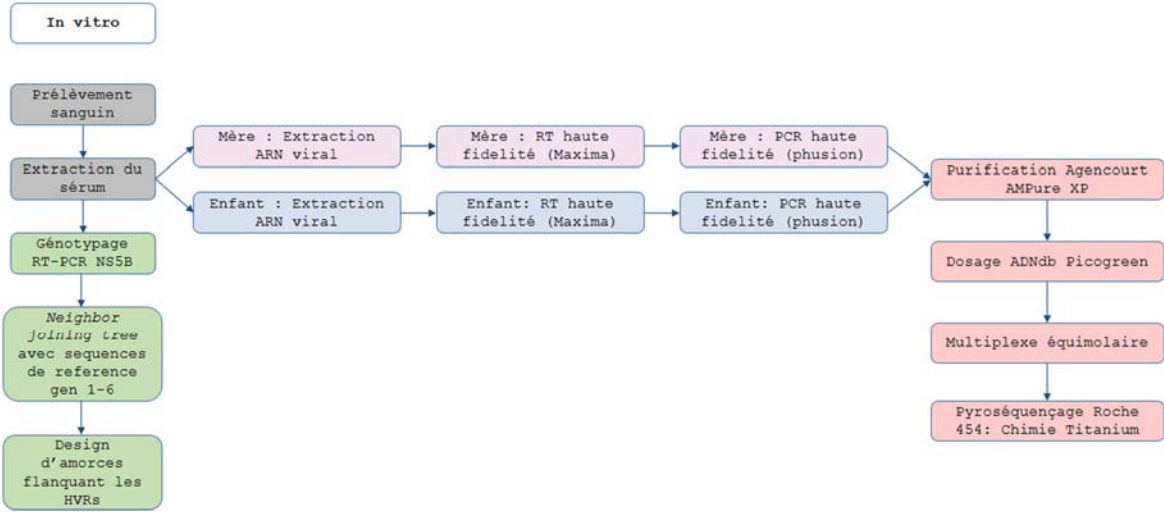
167. Luo C, Tsementzi D, Kyripides N, Read T, Konstantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PloS one*. 2012;7(2):e30087.
168. Lauck M, Alvarado-Mora MV, Becker EA, Bhattacharya D, Striker R, Hughes AL, et al. Analysis of hepatitis C virus intrahost diversity across the coding region by ultradeep pyrosequencing. *Journal of virology*. 2012;86(7):3952-60.

Annexes

Annexe 1 : CD-ROM

Annexe 2 : Schéma expérimental A) *in vitro* et B) *in silico*

A



B

