

# **Virus de l'hépatite C chez la femme enceinte et l'enfant**

Diversité, réponse neutralisante et transmission verticale

par Ariane Larouche

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée

en vue de l'obtention du grade de doctorat

en microbiologie et immunologie

août 2017

© Ariane Larouche, 2017

## Résumé

Le virus de l'hépatite C peut être transmis de la mère à l'enfant pendant la grossesse ou l'accouchement. À l'heure actuelle, il n'existe aucun moyen efficace de prévenir la transmission verticale (TV) du VHC qui se produit à un taux d'environ 5 à 10%. Le VHC est un virus extrêmement hétérogène génétiquement. On le retrouve à l'intérieur de l'hôte sous forme de quasiespèce, une population de variantes distinctes mais génétiquement liées dont la composition est influencée par les pressions de sélection exercées par la réponse immunitaire de l'hôte. La grossesse est associée à des modulations immunitaires permettant l'établissement d'une tolérance envers les antigènes paternels exprimés par l'enfant. Aussi, une étude précédemment publiée par notre groupe a révélé l'existence de pressions sélectives exercées sur l'enveloppe du VHC pendant la grossesse et suggérant l'implication de la réponse neutralisante.

Afin de mieux comprendre l'effet de la réponse humorale maternelle sur l'évolution du VHC pendant la grossesse, et la nature de la quasiespèce transmise lors de la TV du VHC, nous avons caractérisé la composition des populations virales par séquençage à haut débit et évalué la réponse neutralisante spécifique au VHC dans un groupe de 42 femmes enceintes infectées par le VHC seulement (n=19) ou coinfectées par le VHC et le VIH-1 (n=23) et chez 5 couples mère-enfant pour lesquels il a eu TV. À l'aide d'horloges moléculaires, nous avons aussi pu estimer le moment où la TV se produit pendant la grossesse.

En général, une grande diversité de la quasiespèce a été associée à la présence d'une réponse neutralisante efficace. Ce phénotype était associé à un plus faible risque de TV chez les femmes infectées par le VHC seulement mais pas chez les patientes coinfectées. La fraction de la quasiespèce transmise de la mère à l'enfant était aussi 10 fois plus importante en cas de coinfection maternelle par le VIH-1. Finalement, nos estimés du moment de TV suggèrent qu'une transmission in utéro est très probable et pourrait se produire aussi tôt que la fin du premier trimestre de grossesse.

Dans l'ensemble, les résultats démontrent que l'évolution du VHC pendant la grossesse est fortement influencée par la réponse neutralisante maternelle, laquelle est importante pour limiter la transmission du virus à l'enfant chez les femmes infectées par le VHC seulement. Ceci

suggère un mode de TV spécifique, potentiellement lié à la capacité d'attachement du VHC à des véhicules et permettant le transport spécifique de certaines variantes à travers le placenta. Chez les femmes coinfectedes, l'absence d'association entre la réponse neutralisante et la TV, ainsi que la transmission d'un grand nombre de variantes du VHC de la mère à l'enfant suggèrent plutôt un mode de transmission non spécifique, potentiellement lié à une fragilisation de la barrière placentaire ou à une altération de l'immunité foetale pouvant restreindre l'infection.

Les conclusions présentées ici permettent une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la TV du VHC et pourraient apporter des informations précieuses pour la prise en charge des femmes enceintes infectées par le VHC.

**Mots-clés :** VHC, quasiespèce, grossesse, transmission mère-enfant, goulot d'étranglement, réponse neutralisante, coinfection, VIH-1, séquençage à haut débit, facteurs de risque

## **Abstract**

Hepatitis C virus can be transmitted from mother to child during pregnancy and childbirth. At present, there is no effective means to prevent vertical transmission (VT) which occurs in approximately 5 to 10% of cases. HCV is highly diversified and is found as quasispecies, a swarm of closely related yet genetically distinct variants whose composition is influenced by the host immune response. Pregnancy is associated with immune modulations allowing the establishment of maternal tolerance to the fetus, bearing 50% paternal antigens. In addition, we have shown that HCV was subjected to selective pressure targeting the viral envelope during pregnancy and suggesting the involvement of the neutralizing response.

To better understand the effect of the maternal humoral response on HCV evolution during pregnancy, and the nature of the quasispecies fraction that is vertically transmitted, we characterized HCV quasispecies composition by ultradeep sequencing in a group of 42 pregnant women infected with HCV alone (n=19) or coinfecting with HCV and HIV-1 (n=23), et in 5 mother-child pairs for whom HCV VT occurred. Using molecular clock analysis we also estimated the moment of VT during pregnancy.

Overall, a high quasispecies diversity was associated with an effective neutralizing activity. This was also associated with reduced risks of VT in women infected with HCV alone but not in coinfecting patients. The fraction of the quasispecies shared between mother and child was also 10 times more important in the cases where the mother was coinfecting. Finally, estimations of the moment of VT strongly suggest the incidence of early in utero transmission.

Alltogether our results showed that HCV evolution during pregnancy is driven by the maternal neutralizing response, which in turn is important in limiting viral transmission to the child in pregnant women infected with HCV only. This points to a specific mode of VT, potentially related to the ability of HCV to attach to certain vehicles, allowing the transport of specific variants across the placenta. In coinfecting women, the absence of association between neutralizing activity and HCV VT, and the transmission of multiple variants from the mother to the child suggest a non specific route of VT, presumably associated with weakened placental barrier or altered fetal immunity that could have restricted the infection.



Our findings allow for a better understanding of the mechanisms involved in HCV VT and could inform future strategies in the management of HCV-infected pregnant women.

**Keywords** : HCV, quasispecies, pregnancy, vertical transmission, transmission bottleneck, neutralizing response, coinfection, HIV-1, ultradeep sequencing, risk factors

# Table des matières

Virus de l'hépatite C chez la femme enceinte et l'enfant .....	i
Diversité, réponse neutralisante et transmission verticale .....	i
Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures .....	vii
Liste des sigles .....	xi
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Le virus de l'hépatite C (VHC).....	2
1.1 Historique.....	2
1.2 Épidémiologie.....	3
1.3 Transmission.....	4
1.4 Pathogenèse.....	5
1.5 Virologie et cycle de vie du VHC.....	8
1.5.1 Classification.....	8
1.5.2 Organisation génomique et protéines virales.....	8
1.5.3 Structure du virion .....	12
1.5.4 Cycle de vie du VHC .....	15
1.6 Diversité génétique du VHC .....	20
1.6.1 Géotypes et sous-types.....	20
1.6.2 La quasiespèce .....	21
1.6.3 Les régions hypervariables .....	22
1.6.4 Modalités d'étude de la quasiespèce.....	23
1.7 Traitements .....	24
Chapitre 2 : Le VHC chez la femme enceinte et l'enfant .....	26
2.1 Particularités de la grossesse.....	26
2.1.1 L'implantation.....	26

2.1.2 La décidualisation .....	28
2.1.3 La placentation.....	30
2.1.4 La tolérance materno-fœtale .....	33
2.1.5 Progression de la grossesse et environnement pro- ou anti-inflammatoire .....	35
2.2 Pathogenèse du VHC chez la femme enceinte et l'enfant .....	36
2.3 Transmission verticale du VHC.....	37
2.4 Traitements de l'hépatite C chez la femme enceinte et l'enfant.....	40
Objectifs de la thèse.....	41
3.1 Étude de la quasispèce du VHC pendant la grossesse .....	42
Article 1: Quasispecies diversity and neutralizing antibody responses in vertical HCV transmission (soumis à Journal of Clinical Investigation).....	42
3.2 Caractérisation du goulot d'étranglement dans la transmission verticale du VHC. ....	81
Article 2: Vertical transmission of hepatitis C virus: transmission bottleneck and evidence of early in utero infection (Journal of Virology 2017, 91(23) e01372-17).....	82
3.3 Étude d'un cas particulier de transmission verticale du VHC. ....	131
Article 3: Seronegative Hepatitis C Virus Infection in a Child Infected via Mother-to-Child Transmission. (Journal of Clinical Microbiology 2012, 50, 2515-2519).....	131
4. Discussion générale .....	144
Conclusion .....	171
Annexe .....	173
<i>Review</i> .....	173
Pathogenesis of Hepatitis C During Pregnancy and Childhood (Viruses. 2012 Dec; 4(12): 3531–3550).....	173
Bibliographie.....	i

## Liste des figures

<b>Figure 1. Caractéristiques cliniques, virologiques et immunologiques d'une infection par le VHC.</b> A. Infection aiguë suivie d'une clairance spontanée. B. Infection aiguë avec progression vers une infection chronique. Tirée et traduite de Park et al. (32) Copyright (2013) avec permissions d'Elsevier.....	6
<b>Figure 2. Organisation génomique, expression et maturation des protéines virales du VHC.</b> Le génome du VHC est traduit par les ribosomes via l'IRES situé à son extrémité 5' pour produire la polyprotéine. Cette dernière est ensuite clivée par des protéases cellulaires et virales pour produire les protéines matures. Les flèches noires indiquent le clivage par les signal peptidases du RE. La flèche rouge indique un site de clivage par une signal peptide peptidase cellulaire. Les losanges orange et violets indiquent le clivage par les protéases virales NS2 et NS3 respectivement. ....	9
<b>Figure 3. Schéma des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.</b> Les régions variables sont identifiées en rose, la tige en vert et le domaine transmembranaire en bleu foncé. Les sites de N-glycosylation conservés sont identifiés par les symboles oranges et leur position en acide aminés indiquées au-dessus.....	10
<b>Figure 4. Structure du VHC.</b> A. Constituants d'un VHC. B. Modèle de particules lipovirales dans lequel le VHC interagit de façon transitoire avec les lipoprotéines sériques via l'interaction avec apoE (vert). C. Modèle de particule lipovirale hybride où le VHC et la lipoprotéine partagent une même enveloppe lipidique. Adaptée et traduite avec permissions de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology, Lindenbach & Rice (93), copyright (2013)..	14
<b>Figure 5. Processus d'entrée du VHC dans les hépatocytes.</b> Tirée et traduite avec permissions de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology, Lindenbach & Rice (93), Copyright (2013).....	16
<b>Figure 6. Réplication, assemblage et relâche du VHC.</b> A. Traduction des protéines virales et formation du complexe de réplication. B. Transfert du génome viral vers le site d'assemblage et assemblage des virions. C. Sécrétion vésiculaire chez une cellule saine et chez une cellule infectée par le VHC. Tirée et traduite avec permissions de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology, Lindenbach & Rice (93), Copyright (2013).....	19

**Figure 7. Génotypes et sous-type du VHC.** Tirée et traduite de Bukh (119) Copyright (2016) avec permissions d'Elsevier..... 20

**Figure 8. Diversification de la quasiespèce du VHC.** Exemple d'évolution d'une quasiespèce du VHC. Les cercles concentriques représentent les différents cycles de réplication. La longueur des liens entre les variantes représente la distance génétique entre les variantes. Inspirée de Lauring & Andino (121). ..... 21

**Figure 9. Illustration schématique des différentes combinaisons de DAA.** Les lignes de couleur représentent 13 combinaisons de DAA : 1) boceprevir (Victrelis®) + pegIFNA/RBV. 2) telaprevir (Incivek®) + pegIFNA/RBV. 3) sofosbuvir (Sovaldi®) + pegIFNA/RBV. 4) simeprevir (Olysio®) + pegIFNA/RBV. 5) ledipasvir + sofosbuvir (Harvoni®). 6) ombitasvir + paritaprevir + ritonavir + dasabuvir (Viekira Pak™). 7) ombitasvir + paritaprevir ritonavir (Technivie™). 8) daclatasvir (Daklinza™) + sofosbuvir (Sovaldi®). 9) elbasvir + grazoprevir (Zepatier™). 10) sofosbuvir + velpatasvir (Epclusa®). 11) vaniprevir (Vanihep®) + pegIFNA/RBV. 12) asunaprevir (Sunvepra®) + daclatasvir (Daklinza®). 13) voxilaprevir + velpatasvir + sofosbuvir. Les combinisons 1 à 10 ont été approuvées par la FDA et peuvent être utilisées avec ou sans RBV. Les combinisons 11 et 12 sont approuvées au Japon et la combinaison 13 est présentement évaluée par la FDA. Le boceprevir et le telaprevir (en vert) ont été discontinués. Tirée et traduite de Li et. al (136) avec permission d'Elsevier. .... 25

**Figure 10. Représentation schématique de l'utérus.** Image Libre de droits d'auteur..... 27

**Figure 11. Implantation du blastocyste dans l'endomètre.** Tirée et traduite de James et. al (138) avec permissions d'Elsevier. .... 28

**Figure 12. Représentation schématique des structures placentaires chez l'humain en début de grossesse.** A. Environnement intrautérin. On y retrouve l'utérus maternel constitué du myométrium et de la décidua. Les structures embryonnaires incluent le placenta et le cordon ombilical (constitué de deux artères et une veine ombilicals), qui transfère le sang entre le placenta et le fœtus. Ce dernier est entouré par le fluide amniotique. B. Le placenta est constitué de villis flottants et d'ancrage. Il est bordé par la plaque chorionique suivi du cordon ombilical. L'utérus maternel comprend le myométrium, la décidua et les artères spirales. C. Aperçu d'un arbre de villis. Les caractéristiques maternelles présentées ici comprennent la décidua, les glandes utérines, l'artère spirale et l'espace intervilloux (qui est rempli du sang maternel). Les trophoblastes extravilloux (EVT) envahissent et ancrent le placenta dans la décidua (aussi

jusqu'au premier tiers du myométrium. Les structures embryonnaires comprennent le villi flottant et le villi d'ancrage. Les STB recouvrent l'arbre de villis et sont en contact direct avec le sang maternel. Les CTB sont retrouvés entre les STB et la membrane basale. Dans le présent schéma on retrouve une couche continue de CTB ce qui représente la couche de CTB en début de grossesse. Figure tirée et traduite de Delorme-Axford et. al (151). ..... 31

**Figure 13.** Achitecture de l'extrémité d'un villi placentaire A. au premier trimestre de grossesse et B. dans le placenta à terme. Tirée et traduite de Fuchs et. al (154) avec permissions de John Wiley and Sons. .... 33

**Figure 14. Voies hypothétiques de transmission verticale du VHC.** Tirée et traduite de Le Campion et al. (190) ..... 38

**Figure 15. Modèles de transport des lipoprotéines (A) et des IgG (B) à travers la barrière placentaire.** A. Le LDL présent dans le sang maternel lie le LDLR à la membrane apicale des STB. Suivant l'endocytose à pH acide dans les endosomes, le LDL est libéré de son récepteur. Le LDLR est recyclé à la membrane apicale alors que le LDL est dirigé vers le compartiment lysosomal où le cholestéryl ester est hydrolysé et la lipoprotéine est dégradée. La sortie du cholestérol libre de l'endosome tardif multivésiculaire (MVB) pourrait dépendre de NPC1. Le cholestérol libre est utilisé pour la synthèse d'hormones dans la mitochondrie ou entreposé sous la forme de cholestéryl ester. SRB1 localisé à la membrane apicale des STB serait responsable de la prise sélective du cholestéryl ester des HDL a la membrane apicale. SRB1 pourrait aussi jouer le rôle de récepteur endocytique responsable du transport du HDL par transcytose vers la membrane basale. B. Les IgG en haute concentration dans le sang maternel (10-15 mg/mL) sont internalisés à la membrane apicale des STB par endocytose en phase fluide dans les endosomes (pH 6.0) ce qui permet la liaison au FcRn. Le FcRn et l'IgG peuvent ensuite être amené à la membrane plasmique basolatérale ou être recyclés à la membrane apicale. La libération de l'IgG de son récepteur pourrait se produire dans les endosomes à pH neutre ou à la membrane plasmique exposée au stroma (basale) ou au sang maternel (apicale). Les IgG qui ne lient pas le FcRn dans les endosomes apicaux précoces sont transportés par les MVB vers les lysosomes pour y être dégradés. Puisque le FcRn est aussi détecté sur les cellules endothéliales fœtales, il pourrait aussi assurer le transport vers la circulation fœtale. Image tirée et traduite de Fuchs et al. (154) avec permissions de John Wiley and Sons. .... 153

**Figure 16. Modèles de TV du VHC chez la femme enceinte infectée par le VHC seulement ou coinfected par le VHC et le VIH-1..... 165**

## Liste des sigles

ALT: Alanine aminotransférase

AST: Aspartate aminotransférase

BVDV: Virus de la diarrhée virale bovine

CB: Sang de cordon

CHC: Carcinome hépatocellulaire

CLDN1: Claudin 1

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV: Cytomégalovirus

CSE: Cellules stromales endométriales

CSFV: Virus de la peste porcine

CTB: Cytotrophoblastes

DC: Cellules dendritiques

DENV: Virus de la Dengue

DTM: Domaine transmembranaire

EGFR: Epidermal growth factor receptor

EVT: Trophoblastes extravilleux

GSIs: Gènes stimulés par l'interferon

HAART: Highly active antiviral therapy

HBsAg: Antigène de surface du virus de l'hépatite B

hCG: Human chorionic gonadotrophin

HSPG: Sulfates d'héparane associés aux proteoglycans

HVR: Région hypervariable



IFNA: Interferon alpha  
IFNG: Interferon gamma  
IMF: Interface materno-fœtale  
IRES: Internal ribosome entry site  
JEV: Virus de l'encéphalite japonaise  
KIR: Killer-cell immunoglobulin-like receptor  
LB: Lymphocyte B  
LDL: Low density lipoprotein  
LDL-R: Récepteur des LDL  
LT: Lymphocytes T  
MAVS: Mitochondrial antiviral-signaling protein  
MEC: Matrice extracellulaire  
MMP: Métalloprotéinases  
NPC1L1: Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor  
OCLN: Occludin  
OMS: Organisation mondiale de la santé  
PBMC: Peripheral blood mononuclear cells  
RE: Réticulum endoplasmique  
REr: RE rugueux  
RM: Réseau membranneux  
SLN: Signal de localisation nucléaire  
SRB1: Scavenger receptor class B member 1  
STB: Syncytiotrophoblastes  
TfR1: Transferrin receptor 1

TRIF: TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$

TV: Transmission verticale

UDI: Utilisateur de drogues injectables

uNK: Cellules NK utérines

UTR: Régions non traduites

VHA: Virus de l'hépatite A

VHB: Virus de l'hépatite B

VHC: Virus de l'hépatite C

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VLDL: Very low density lipoprotein

VR: Région variable

WNV: Virus du nil occidental

YFV: Virus de la fièvre jaune

## Liste des abréviations

AcN : Anticorps neutralisants

Apo : Apolipoprotéines

Tregs: Cellules T régulatrices

*À ma mère Carmen, mon roc, mon inspiration...*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche et mentor, le Dr Hugo Soudeyns, avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant les 7 dernières années. Je serai toujours impressionnée par sa passion contagieuse pour la recherche et le dévouement qu'il porte à ses étudiants. Il a toujours été disponible pour répondre à mes questions, à mes inquiétudes, et pour discuter science et ce, malgré un horaire extrêmement chargé. Ses encouragements, son soutien, et la confiance qu'il a eu en mes capacités à de nombreuses occasions, alors que la confiance en moi-même me manquait, m'ont permis d'avancer dans les moments difficiles, et m'ont poussé à dépasser mes limites et à croire en moi. Merci Hugo.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du labo avec qui j'ai travaillé pendant mon passage au centre de recherche du CHU Sainte-Justine. Merci pour ces discussions et échanges d'idées qui ont permis au projet d'avancer. Merci d'avoir toujours été prêts à aider et collaborer sur différents projets. Merci pour votre patience et votre compréhension. Je n'aurais jamais pu effectuer tout ce travail sans vous. Merci aussi pour vos sourires et votre amitié qui ont rendu mon séjour si agréable. Merci Armelle Le Champion, Sébastien Fauteux-Daniel, Kimberly Ann Milton McSween, Virginie Calderon, Martine Caty, Doris Ransy, Insaf Salem, Silvie Valois, Catherine Gravel, Laurence Raymond Marchand, Natacha Merindol, Amélie Pagliuzza et Hinatea Dieumegard.

J'aimerais finalement remercier ma famille et mes amis sans qui je n'aurais jamais pu réussir. Merci pour votre soutien et vos encouragements. Merci d'avoir cru en moi. Merci d'avoir enjolivé mes fins de semaines et soirées par votre compagnie. Un merci tout spécial à ma maman, qui m'a inconditionnellement aimé, soutenu, écouté, consolé, conseillé. Sans elle, je ne serais pas là où je suis aujourd'hui, dans tous les sens du terme. Tu as toujours été là pour moi pendant les bons et les moins bons moments, tu as toujours cru en moi et tu m'as toujours encouragé à me dépasser, à affronter les défis et devenir quelqu'un de meilleur. Je ne t'en remercierai jamais assez. Cette thèse elle t'est dédiée.

Merci

# **Introduction**

# Chapitre 1 : Le virus de l'hépatite C (VHC)

## 1.1 Historique

C'est pendant la première guerre mondiale, en 1917, que fut instauré le premier dépôt de sang. En 1930, le premier réseau de locaux entreposant du sang est créé par les Soviétiques, et le terme « banque de sang » voit le jour en 1937. Avec l'arrivée de la seconde guerre mondiale, le réseau de banques de sang s'est considérablement développé (1). C'est en 1943 que fut décrit par Paul Beeson le premier cas d'hépatite acquise suite à une transfusion sanguine (hépatite post-transfusionnelle). En 1944 et 1945, MacCallum et ses collègues font la distinction entre deux types d'hépatites, soit l'hépatite infectieuse et l'hépatite sérique, causées par deux agents étiologiques distincts (2-4), qui seront en 1947 renommés hépatite A et hépatite B respectivement. En 1965, l'antigène « Australia » est détecté dans le sérum d'un Australien aborigène et chez quelques Américains atteints de leucémie (5, 6). Deux ans plus tard, cet antigène est associé à l'hépatite B (7-9), donnant ainsi la chance aux scientifiques d'identifier les porteurs asymptomatiques et de cribler les banques de sang, rendant ainsi les transfusions plus sécuritaires (10). On connaît aujourd'hui l'antigène « Australia » comme étant l'antigène de surface (HBsAg) du virus de l'hépatite B (VHB). Le virus de l'hépatite A (VHA), pour sa part, fut identifié en 1973 par l'équipe du Dr Stephen Feinstone (11). En 1975, l'utilisation de tests sérologiques pour détecter le VHA et le VHB permit de découvrir que la plupart des hépatites post-transfusionnelles n'étaient dues à aucun des deux agents, et donc qu'un autre pathogène causant une hépatite serait en cause. Plusieurs années d'efforts de recherche furent nécessaires pour identifier et caractériser l'agent étiologique responsable de l'hépatite non-A-non-B. Ce n'est qu'en 1989 que l'équipe du Dr Michael Houghton pu isoler et caractériser un clone dérivé du génome du virus de l'hépatite C (VHC) suite au criblage de librairie d'ADNc dérivée de sérum de chimpanzés infectés par le sérum de patients atteints d'hépatite C (12).

## 1.2 Épidémiologie

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), on estime à 130-150 millions le nombre d'individus chroniquement infectés par le VHC dans le monde (13), ce qui représente environ 2% de la population planétaire. Cette prévalence varie grandement à l'échelle mondiale, les régions les plus touchées étant l'Asie centrale, l'Asie de l'est, l'Afrique du nord et l'Afrique moyen-orientale, avec des taux d'infection dépassant les 3.5% (14). Les pays ayant les séroprévalences (présence d'anticorps anti-VHC) les plus élevées sont l'Égypte (14.7%), le Cameroun (11.6%), l'Ouzbékistan (11.3%), le Gabon (11.2%) et la Mongolie (10.8%) (15). On estime que 3-4 millions d'individus sont nouvellement infectés par le VHC chaque année (16). En 2013, le nombre de morts annuelles résultant de pathologies hépatiques liées au VHC était de près de 700 000 (17).

Il est important de mentionner que la plupart des statistiques présentées ci-dessus découlent d'études de séroprévalence, donc de la présence d'anticorps spécifique au VHC. Ces données surestiment probablement la prévalence réelle des infections par le VHC car la présence d'anticorps spécifiques au VHC peut témoigner d'une infection chronique mais aussi d'une infection passée. Une étude de modélisation plus récente, basée sur la détection des infections virémiques (présence d'ARN du VHC) révélait que « seulement » 71.1 millions d'individus seraient activement infectés par le VHC, soit 50% de moins que le nombre estimé par les études antérieures (18). Dans un autre ordre d'idées, les infections non diagnostiquées et le manque de partage de données pour certaines régions du globe contribuent certainement à une sous-estimation de la prévalence réelle des infections à VHC.

Chez les femmes enceintes, on estime la prévalence du VHC entre 0.15 et 8,6% mondialement. Les taux les plus faibles se retrouvent encore une fois dans les régions plus développées, comme l'Europe et les États-Unis (0.15 à 2.4%), et les plus hautes prévalences sont retrouvées dans des pays comme l'Égypte (8.6%). La prévalence chez les enfants se situe plutôt entre 0.05 et 5% (19). Dans les pays développés, la principale voie d'acquisition du VHC chez les enfants est la transmission verticale (TV), soit la transmission de la mère à l'enfant.



## 1.3 Transmission

Le VHC est un virus transmissible par le sang. Après la deuxième guerre mondiale, l'épidémie de VHC s'est rapidement propagée suite à l'augmentation du nombre de transfusions, de procédures médicales et d'injections. À cette époque, la stérilisation des instruments médicaux était inadéquate et le dépistage du sang et de ses dérivés n'était pas effectué, favorisant ainsi la propagation rapide du virus (20, 21). Dans les pays développés, l'instauration d'un programme de dépistage systématique des produits du sang et l'amélioration des procédures de stérilisation a permis de réduire énormément la propagation du VHC par ces voies, et aucun cas de transmission du VHC lié à l'utilisation de sang ou de ses dérivés n'a été recensé depuis 1994 (21, 22). Dans ces régions, le partage des seringues entre utilisateurs de drogues injectables (UDI) est devenu la principale route d'acquisition du VHC (23). À l'opposé, dans les régions en développement, la transmission par voie iatrogène, ou suite à une transfusion ou à une procédure médicale non sécuritaire est encore courante. Cela est dû au manque de ressources entravant notamment le dépistage systématique des unités de sang, la formation adéquate des professionnels de la santé et l'utilisation de matériel médical sécuritaire (21, 22).

La transmission du VHC par contact sexuel reste controversée car la plupart des cas reportés ne peuvent exclure de façon absolue l'implication d'autres modes de transmission du virus (24). Elle serait notamment très rare chez les couples hétérosexuels monogames (environ 1 par 190 000 contacts sexuels). Une augmentation du risque est observée pour les personnes ayant de multiples partenaires sexuels, les personnes porteuses d'infections sexuellement transmissibles et celles infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (25). Il semblerait aussi que la transmission de la femme à l'homme soit plutôt rare (26). Chez les couples homosexuels masculins, on a aussi constaté une augmentation du risque associée à l'infection par le VIH et liée à des pratiques sexuelles particulières pouvant causer des traumatismes au niveau des muqueuses (24). Par contre, il est généralement accepté que dans ces derniers cas, la transmission résulte fort probablement d'un contact avec le sang du partenaire infecté plutôt qu'à une réelle transmission par contact sexuel.

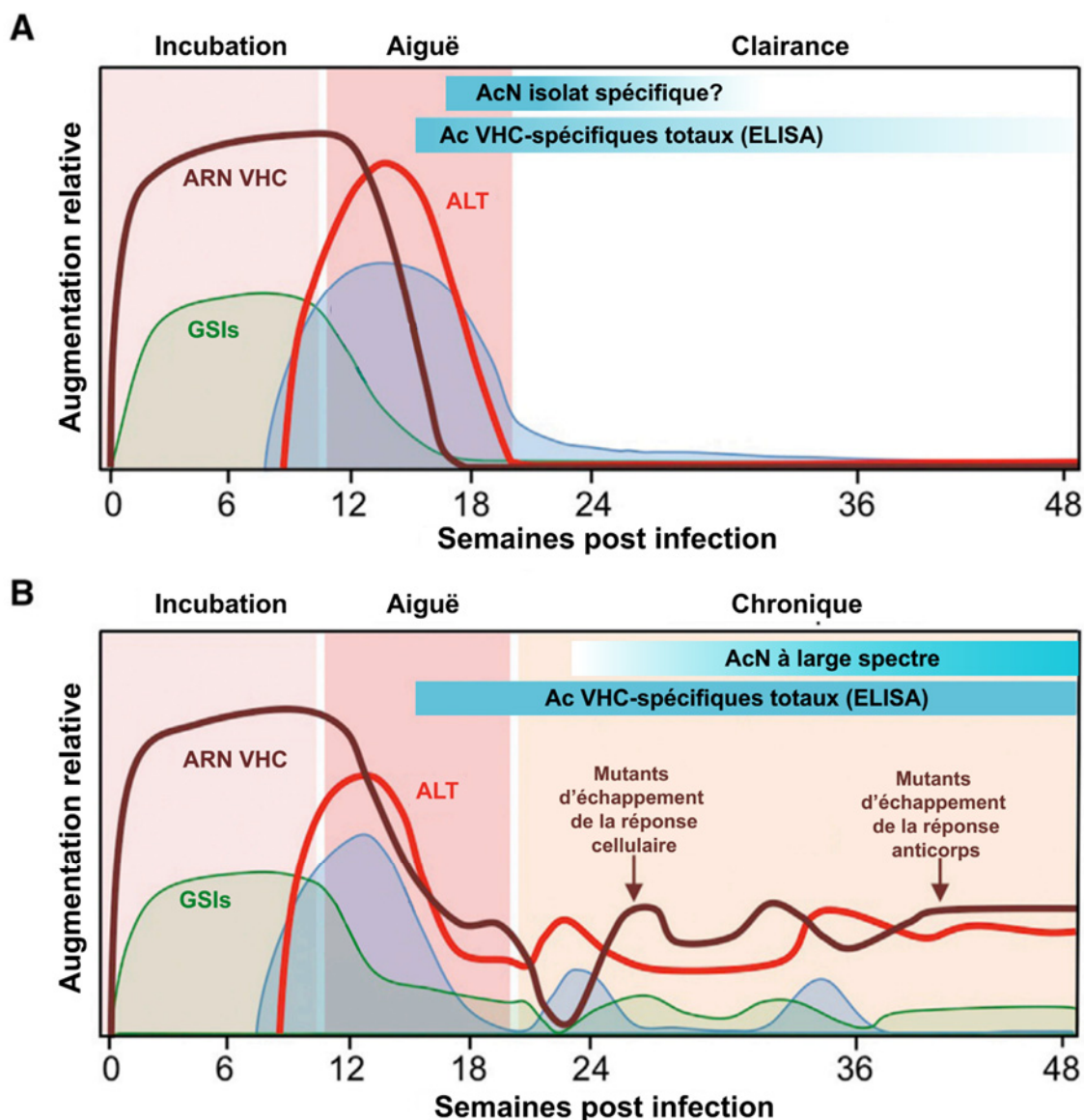
Tel que mentionné plus tôt, le VHC peut être transmis de la mère à l'enfant. Ce mode de transmission est relativement inefficace avec un taux de moins de 10%. Les facteurs de risques

ainsi que les mécanismes potentiellement impliqués dans la TV du VHC seront présentés en détails au chapitre 2.

Outre ceux mentionnés ci-dessus, d'autres modes de transmission du VHC ont été rapportés, notamment associés à l'acupuncture, aux tatouages et aux piercings là où les conditions d'hygiène sont inadéquates (22, 27).

## **1.4 Pathogenèse**

L'hépatite C se présente en deux phases : aiguë et chronique. Les six premiers mois suivant l'infection initiale correspondent à la phase aiguë de la maladie. Elle est très souvent non diagnostiquée, car à cette étape, seulement 15 à 30% des patients présenteront des symptômes (28). Ces derniers apparaissent habituellement de 5 à 12 semaines après l'infection (29) et s'apparenteront à des symptômes grippaux dans une grande majorité de cas, bien que des manifestations plus spécifique du VHC tels qu'une jaunisse et une urine foncée aient été observées chez une minorité de patients en phase aiguë (30). Le virus est détectable 2 à 14 jours suivant l'inoculation (29). Après en moyenne 9 jours post infection, il entre dans une phase de croissance exponentielle, concomitante à l'expression des gènes stimulés par l'interféron (GSIs), qui sera suivie d'une phase plateau pendant laquelle la charge virale élevée atteinte sera maintenue en moyenne 56 jours (31, 32) (Figure 1). Environ 8 à 12 semaines post infection, les réponses CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC sont enclenchées et coïncident avec l'élévation du niveau des aminotransférases (alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST)), marqueurs de l'inflammation hépatique, résultant de la destruction des hépatocytes infectés par les lymphocytes T cytotoxiques, ce qui entraîne une baisse de la virémie (32, 33). Les anticorps spécifique au VHC apparaissent après la réponse à médiation cellulaire, en général de 20 à 150 jours suivant l'infection (29).



**Figure 1. Caractéristiques cliniques, virologiques et immunologiques d'une infection par le VHC.** A. Infection aiguë suivie d'une clairance spontanée. B. Infection aiguë avec progression vers une infection chronique. Tirée et traduite de Park et al. (32) Copyright (2013) avec permissions d'Elsevier.

La baisse de virémie marque la fin de la phase aiguë. Suite à cela, on observe soit une résolution spontanée de l'infection (environ 25% des cas), soit une progression vers une atteinte chronique (34). On ne connaît pas les mécanismes exacts faisant en sorte que certains patients arrivent à éliminer le virus par eux même alors que d'autres non. Cependant, certains facteurs

reliés à l'hôte et d'autres liés au virus ont été associés à la probabilité de clairance spontanée. Parmi les facteurs de l'hôte, le sexe féminin (35), le développement rapide d'une réponse T CD4+ VHC-spécifique soutenue (32, 36), une infection préexistante par le VHB ou le VHA (37), l'absence d'infection par le VIH-1, certaines origines ethniques (38), et plus particulièrement le polymorphisme favorable (allèle CC) en amont du gène IL28B (39) ont été positivement associés à la clairance spontanée. L'apparition d'une réponse T CD8+ VHC-spécifique vigoureuse et ciblant un spectre étendu d'épitopes du VHC, et l'expansion de cellules T VHC-spécifiques polyfonctionnelles, ont aussi été associées au contrôle de l'infection aiguë primaire et à la protection contre la réinfection respectivement (33, 40, 41). De plus, on pense que l'expression prolongée des GSIs entraverait le développement d'une réponse immunitaire adaptative adéquate et le contrôle de l'infection (32). L'implication de la réponse humorale reste quant à elle controversée. Alors que certaines études tendent à démontrer qu'elle n'est pas nécessaire pour éradiquer l'infection, comme chez des individus déficients en production d'anticorps (42), l'apparition précoce d'anticorps neutralisants à forte réactivité croisée (43-45) ou dirigés contre la première région hypervariable (HVR1) de la protéine d'enveloppe E2 du VHC a été plus souvent observée chez les patients qui éliminent le virus que chez ceux qui progressent vers une infection chronique (46).

Parmi les facteurs reliés au virus, la complexité et la dynamique des populations virales ont aussi été associées à l'issue de l'infection aiguë. Ray et al. ont décelé une plus grande diversité génétique de l'enveloppe du VHC chez les patients progressant vers une infection chronique (47). Une baisse de diversité des populations virales suivant l'apparition de la réponse anticorps VHC-spécifique a aussi été observée dans la même catégorie de patients (48). À l'opposé, une étude plus récente a mis en lumière une plus forte occurrence de mutations non-synonymes dans l'enveloppe du VHC chez les patients qui éliminent l'infection (49). Une virémie élevée pendant le premier mois de l'infection (49) et l'infection par le génotype 1 du VHC (50) ont aussi été associées à une meilleure chance de résolution spontanée par certaines équipes alors que d'autres n'ont pas trouvé d'associations entre l'issue de l'infection aiguë et le génotype du VHC (51, 52).

L'infection chronique par le VHC évolue lentement. Cependant, si elle n'est pas traitée, elle mène à la cirrhose chez environ 10 à 20% des patients après 20 à 30 ans. Une fois la

cirrhose établie, le risque annuel de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) ou des signes de décompensation hépatique, deux conditions pouvant justifier le recours à la transplantation du foie, sont de 1 à 5% et de 3 à 6% respectivement (30, 53). L'infection chronique est caractérisée par une inflammation persistante (54), un épuisement clonal des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (32, 55), l'apparition rapide de mutants d'échappement (56, 57), l'induction de cellules T et de cytokines régulatrices (58, 59) et la production d'anticorps neutralisants (AcN) qui, malgré leur réactivité croisée, n'arrivent pas à contenir l'infection (60).

## **1.5 Virologie et cycle de vie du VHC**

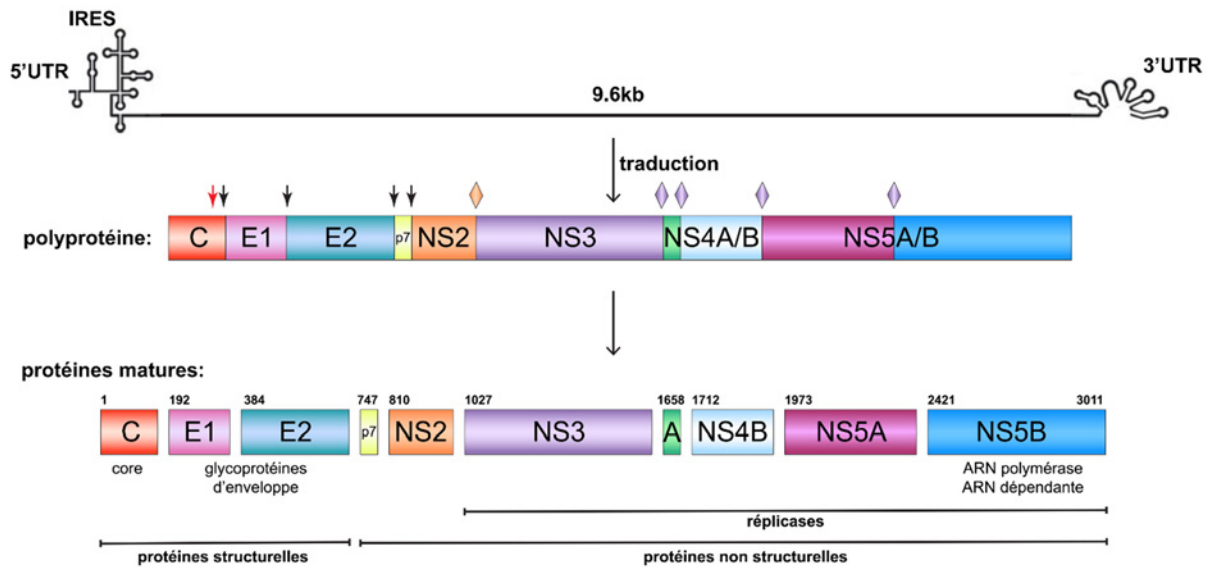
### **1.5.1 Classification**

Le VHC est un petit virus hépatotrophique enveloppé mesurant 50 à 80 nanomètres de diamètre et appartenant à la famille des *Flaviviridae* (61). Cette famille comporte quatre genres : le genre *Flavivirus*, comprenant des espèces telles que le virus de la Dengue (DENV), le virus du Nil occidental (WNV), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et le virus de la fièvre jaune (YFV), les *Pestivirus* (virus de la diarrhée virale bovine (BVDV), virus de la peste porcine classique (CSFV)), les *Pegivirus*, et, finalement, le genre *Hepacivirus*, auquel appartient le VHC. Le VHC est lui-même subdivisé en 7 génotypes majeurs et plus de 67 sous-types. Comme tous les membres des *Flaviviridae*, il possède un génome constitué d'ARN monocaténaire non segmenté de polarité positive qui est directement traduit par la machinerie cellulaire pour ainsi produire les différentes protéines virales (62-64).

### **1.5.2 Organisation génomique et protéines virales**

Le génome du VHC est constitué d'environ 9600 bases. Il comporte un long cadre de lecture ouvert dont la traduction résulte en une unique polyprotéine de plus de 3000 acides aminés qui sera subséquentement clivée avec l'aide des protéases virales et cellulaires pour former les dix principales protéines virales soit Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (63) (Figure 2). Les protéines présentes en N-terminal sont dites « structurelles » puisqu'elles entrent dans la composition du virion. Celles en C-terminal sont dites « non-

structurelles » et participent de différentes façons au cycle de réplication du VHC. À chacune des extrémités de la région codante se trouvent des régions non traduites (5'UTR et 3'UTR) hautement structurées et contenant des éléments essentiels à la traduction et à la réplication du génome viral (65).



**Figure 2. Organisation génomique, expression et maturation des protéines virales du VHC.** Le génome du VHC est traduit par les ribosomes via l'IRES situé à son extrémité 5' pour produire la polyprotéine. Cette dernière est ensuite clivée par des protéases cellulaires et virales pour produire les protéines matures. Les flèches noires indiquent le clivage par les signal peptidases du RE. La flèche rouge indique un site de clivage par une signal peptide peptidase cellulaire. Les losanges orange et violets indiquent le clivage par les protéases virales NS2 et NS3 respectivement.

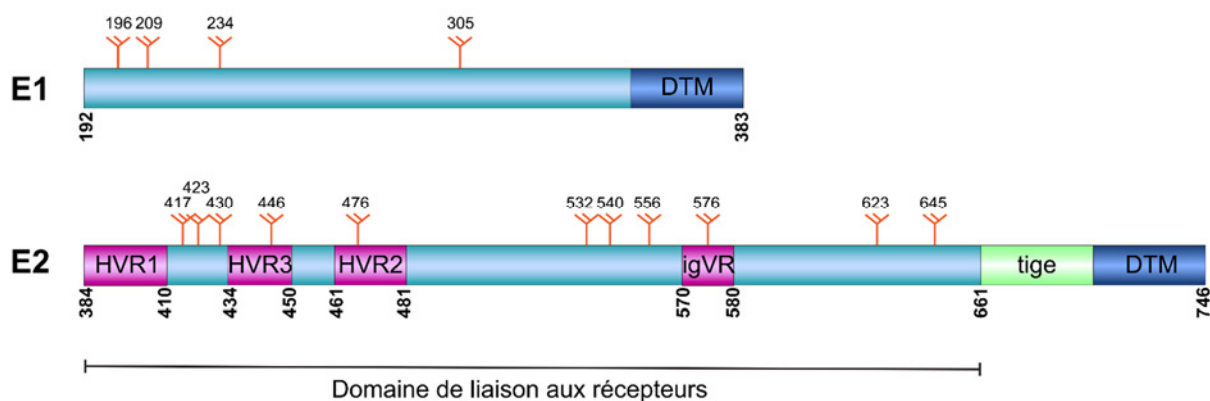
### Les protéines structurales

**Core :** Protéine constituant la capside et liant l'ARN, sa principale fonction est l'encapsulation du génome viral. Elle est constituée de trois domaines. Le domaine 1 est constitué des 122 résidus en N-terminal de la protéine et est impliqué dans la liaison à l'ARN. Le domaine 2 représente la partie C-terminale de la protéine mature et permet l'association de Core avec les gouttelettes lipidiques et les membranes du réticulum endoplasmique (RE). Le domaine 3 se retrouve en C-terminal de la protéine immature et sert de signal pour le clivage d'E1 (66). Outre son implication dans l'assemblage des virions, Core possède de multiples fonctions via son

interaction avec de nombreux facteurs cellulaires. Elle est notamment impliquée dans le développement du CHC (67) et module la réponse immunitaire en réponse au VHC (66).

E1 et E2 : Protéines d'enveloppe fortement glycosylées permettant l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules cibles. Ce sont des protéines transmembranaires de type I qui formeraient des trimères d'hétérodimères via l'interaction de leur domaines transmembranaires respectifs, et qui seraient ancrées à la surface des virions (68, 69). La protéine E1 est constituée d'un domaine transmembranaire en C-terminal, et d'un ecto-domaine en N-terminal (Figure 3). Elle possède en général quatre sites de N-glycosylation conservés. Son rôle exact dans le processus d'entrée du VHC est encore mal compris (70). On sait par contre que son interaction avec E2 est essentielle pour la liaison aux récepteurs du VHC ainsi que pour la fusion avec la membrane des endosomes une fois le virus internalisé (71).

La protéine E2 consiste en un domaine de liaison aux récepteurs relié au domaine transmembranaire (DTM) par une région très conservée appelée la tige (70) (Figure 3). À l'intérieur de son domaine de liaison aux récepteurs, on retrouve des régions variables (VR) et hypervariables (HVR), fortement ciblées par la réponse humorale et jouant un rôle important dans l'évasion immunitaire du VHC (70, 72). On retrouve notamment HVR1 (a.a. 384 – 410) (73), HVR2 (a.a. 461 – 481) (74, 75), HVR3 (a.a. 434 – 450) (76, 77) et igVR (a.a. 570 – 580) (74). On retrouve habituellement onze sites de N-glycosylation conservés sur E2. Au final, les glycans peuvent constituer jusqu'à 50% de la masse du dimère E1/E2 (78).



**Figure 3. Schéma des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.** Les régions variables sont identifiées en rose, la tige en vert et le domaine transmembranaire en bleu foncé. Les sites de N-glycosylation

conservés sont identifiés par les symboles oranges et leur position en acide aminés indiquées au-dessus.

On a longtemps pensé qu'E1 et E2 étaient des protéines de fusion de classe II à cause de l'homologie de leur séquence protéique avec celle des glycoprotéines des flavivirus (79). La structure du cœur d'E2 récemment résolue par cristallographie a plutôt démontré une conformation compacte et globulaire n'ayant rien à voir avec la structure allongée des protéines de fusion de classe II (75, 80). Une structure cristalline d'une partie du domaine N-terminal d'E1 a été résolue par El Omari et al. (81) révélant aussi une structure différente de celle des protéines de fusion de classe II. Il faut cependant garder en tête que ces structures cristallines ont été réalisées indépendamment pour E1 et E2, et ne comportent pas les séquences complètes des deux protéines. La future résolution de la structure de l'hétérodimère E1/E2, potentiellement réalisable à l'aide de nouvelles méthodes comme la cryo-microscopie électronique, sera beaucoup plus informative quant à la conformation réelle des glycoprotéines d'enveloppes présentes à la surface des virions.

### **Les protéines non structurales**

p7 : Petite protéine hydrophobe faisant partie de la famille des viroporines (forment des canaux ioniques et/ou des pores) et indispensable à l'assemblage et la relâche des virions infectieux (82).

NS2 : Cystéine protéase présente sous forme de dimères ancrés dans la membrane par sa région N-terminale. Sa fonction principale est l'auto-clivage de la jonction NS2-NS3 effectué via son site catalytique contenu dans la portion C-terminale. Indépendamment de sa fonction protéase, elle joue un rôle important dans l'assemblage des particules virales infectieuses via des interactions avec plusieurs autres protéines virales (83).

NS3-4A : NS3 est une protéine multifonctionnelle possédant un domaine sérine protéase (N-terminal) et une région ARN hélicase (C-terminal). Elle forme un complexe avec NS4A qui agit en tant que cofacteur pour son activité protéase. C'est par la région N-terminale hydrophobe de NS4A que le complexe est enchâssé aux membranes. On retrouve le complexe au niveau du RE mais aussi associé à la membrane externe des mitochondries et au niveau des complexes de réplication (84). Le rôle précis de la fonction hélicase dans le cycle de vie du VHC est encore



mal compris. On sait par contre que cette fonction est essentielle à la réplication du génome viral (85) et à l'assemblage des particules virales (86). L'activité protéase du complexe NS3-4A est essentielle à la production des protéines virales matures car elle clive la polyprotéine à plusieurs endroits, soit aux jonctions de NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A et NS5A/5B (87) (Figure 2). Au niveau des mitochondries, le complexe NS3-4A bloque les voies de signalisation de la réponse immunitaire innée en clivant les protéines adaptatrices MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein) et TRIF (TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) qui activent habituellement la voie d'induction des interférons de type I suite à la détection d'ARN viral cytosolique par RIG-I et d'ARN viral dans les endosomes par le TLR3, respectivement (88, 89).

NS4B : Protéine membranaire induisant un réarrangement des membranes cellulaires menant à la formation du réseau membranaire (RM), un ensemble de structures membranaires où se retrouvent les complexes de réplication et d'assemblage du VHC (83, 90).

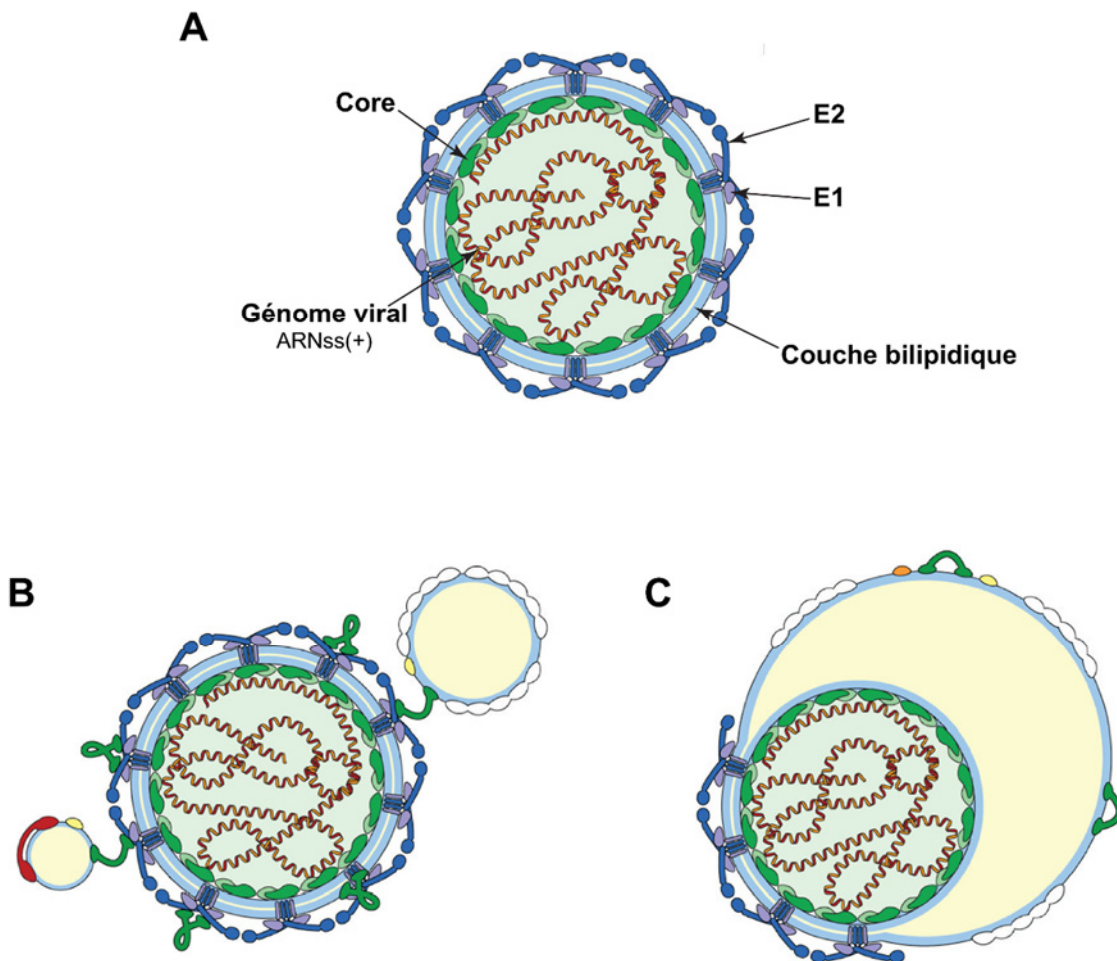
NS5A : Phosphoprotéine liant l'ARN et ancrée au feuillet cytosolique des membranes du RE et des gouttelettes lipidiques. Elle est constituée de trois domaines, D1, D2 et D3. D1 et D2 sont principalement impliqués dans la réplication de l'ARN alors que D3 est essentiel à l'assemblage des virions (83, 91).

NS5B : ARN polymérase ARN dépendante, elle assure la réplication du génome viral (83). Elle ne possède pas de mécanisme de correction d'erreur et est responsable de la grande diversité génétique retrouvée chez les VHC (92).

### **1.5.3 Structure du virion**

Les particules virales sont constituées d'une nucléocapside (capside + génome viral) enrobée d'une couche bilipidique dérivée de la membrane du RE, dans laquelle sont enchâssées les deux glycoprotéines d'enveloppe (E1 et E2) sous forme de trimères d'hétérodimères (61, 68). La capsid, de forme icosaédrique, est constituée de plusieurs monomères de la protéine Core et contient une seule copie du génome viral (Figure 4A). Les virions se présentent sous la forme de particules lipovirales car ils sont associés à des lipoprotéines. Leur contenu lipidique ressemble à celui des VLDL (very low density lipoprotein) et LDL (low density lipoprotein) et

inclut plusieurs apolipoprotéines (apo) notamment apoB, apoC1 et apoE (93). Cette caractéristique leur donne une densité très faible comparativement aux autres virus enveloppés à génome d'ARN. Leur densité est en général située entre 1.03 et 1.20 g/cm<sup>3</sup> et est associée à leur infectivité (94). On retrouve les virions les plus infectieux dans les fractions de moindre densité, possiblement parce que l'association aux lipoprotéines module l'attachement du VHC à ses récepteurs lors de l'entrée et protège le virus de la neutralisation par les anticorps en camouflant certains épitopes (95). Il n'y a pas encore de certitudes en ce qui a trait à la manière dont le VHC interagit avec les lipoprotéines mais deux modèles ont été proposés. Dans le premier modèle, on suggère que le VHC serait associé aux particules lipoprotéiques de manière transitoire via l'interaction avec apoE (Figure 4B). Le deuxième modèle suggère plutôt que la particule lipovirale serait un hybride virion-lipoprotéines partageant la même enveloppe (Figure 4C) (93).



**Figure 4. Structure du VHC.** A. Constituants d'un VHC. B. Modèle de particules lipovirales dans lequel le VHC interagit de façon transitoire avec les lipoprotéines sériques via l'interaction avec apoE (vert). C. Modèle de particule lipovirale hybride où le VHC et la lipoprotéine partagent une même enveloppe lipidique. Adaptée et traduite avec permissions de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology, Lindenbach & Rice (93), copyright (2013).

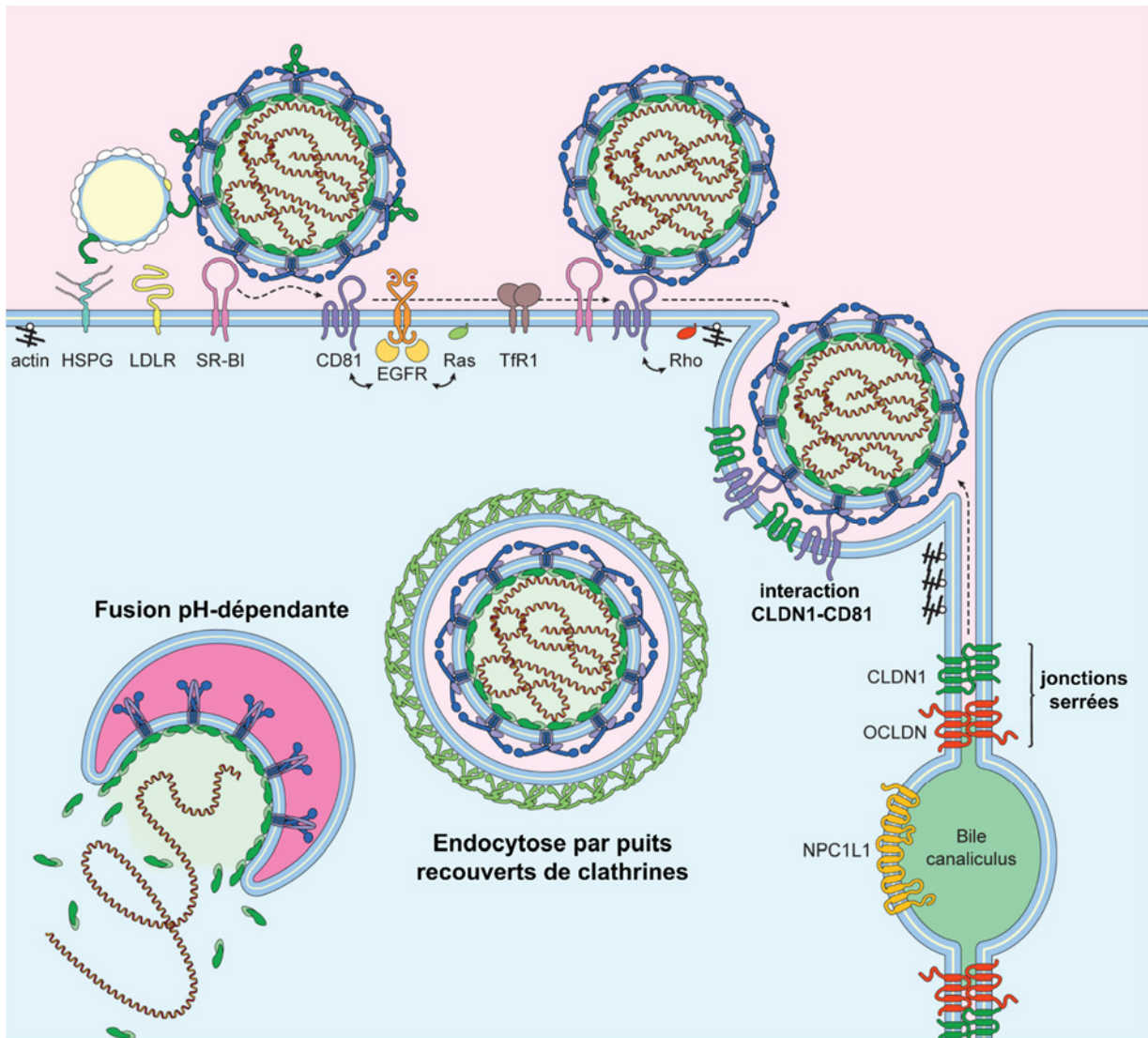
## 1.5.4 Cycle de vie du VHC

### **Attachement, internalisation et fusion**

Le processus d'entrée du VHC à l'intérieur des hépatocytes est complexe et implique des interactions avec plusieurs facteurs d'attachement et récepteurs (Figure 5). Le virus interagirait d'abord avec les sulfates d'héparane associés aux proteoglycans (HSPG) présents à la surface des hépatocytes. Cette liaison initiale de faible affinité impliquerait des résidus chargés positivement dans HVR1 ainsi que la protéine apoE présente à la surface des virions (96, 97). Le récepteur des LDL (LDL-R) pourrait aussi agir en tant que facteur d'attachement via la liaison à apoE (98). Entrent ensuite en jeu cinq récepteurs : le Scavenger receptor class B member 1 (SRB1), la tétraspannine CD81, les protéines de jonctions serrées Claudin-1 (CLDN1) et Occludin (OCLN) et le Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor (NPC1L1) (93).

SRB1 est fortement exprimé à la surface des hépatocytes, où il joue un rôle essentiel dans le métabolisme du cholestérol (99). Il serait impliqué dans l'attachement et l'entrée du VHC de trois façons : il permettrait d'abord l'attachement du virus à la cellule hôte en liant des composantes des lipoprotéines associées aux virions. Suite à l'attachement, la fonction de transfert des lipides de SRB1 serait requise pour l'entrée suivant un mécanisme encore non élucidé mais qui pourrait servir à libérer les virions de leur association aux lipoprotéines et/ou à transférer le VHC vers CD81. Finalement, SRB1 interagirait de manière directe et indirecte avec la région HVR1 de l'enveloppe virale, possiblement via l'interaction avec apoA (61, 72) ce qui rendrait accessibles des résidus d'E2 impliqués dans la liaison à CD81 (100-102).

L'engagement de CD81 et d'E2 provoquerait ensuite la relocalisation du complexe VHC-CD81 vers les jonctions serrées par un mécanisme de réarrangement de l'actine induit via la signalisation par le epidermal growth factor receptor (EGFR) et permettant ainsi le contact avec les protéines CLDN1 et OCLN (103). L'interaction avec CLDN1 induirait alors l'endocytose dépendante des clathrines du complexe VHC-CD81. On croit que la protéine de jonction OCLN ainsi que le transferrin receptor 1 (TfR1) seraient aussi impliqués dans l'internalisation (102).



**Figure 5. Processus d'entrée du VHC dans les hépatocytes.** Tirée et traduite avec permissions de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology, Lindenbach & Rice (93), Copyright (2013).

Suite à son internalisation, le VHC est dirigé vers les endosomes précoces où l'acidification permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et la relâche du génome du VHC dans le cytoplasme (102). Les molécules ainsi que le mécanisme exact menant à la fusion des membranes virale et cellulaire n'ont pas encore été élucidés. Par contre, l'interaction entre CD81 et E2 semble conditionner le virion à répondre au changement de pH nécessaire à la fusion, probablement via un changement de conformation du complexe E1/E2 (104). Le contenu en apolipoprotéines, notamment apoE et apoC1, serait

modulé par HVR1 et jouerait un rôle clé dans le processus de fusion (105, 106). Certains résidus d'E1 et la capacité de dimérisation d'E1/E2 seraient aussi importants (107).

Finalement, en 2012, le récepteur NPC1L1 a été identifié comme un facteur cellulaire impliqué dans l'entrée du VHC. On le retrouve sur la membrane cellulaire du côté apical des hépatocytes au niveau des canaux biliaires où il est impliqué dans l'homéostasie du cholestérol. Bien qu'on ne sache pas de quelle manière NPC1L1 interagit avec le VHC pendant le processus d'entrée, Sainz et al. ont pu démontrer qu'il agirait juste avant ou au moment de la fusion au niveau des endosomes, et que sa fonction d'absorption du cholestérol serait impliquée (108).

### **Traduction, maturation des protéines virales et réplication**

Suite à la fusion des membranes virale et cellulaire, l'ARN du VHC est libéré dans le cytoplasme. Il est alors directement traduit par les ribosomes au niveau du RE rugueux (REr) grâce à un IRES (internal ribosome entry site) situé à son extrémité 5'. La polyprotéine ainsi produite est immédiatement prise en charge par les protéases cellulaires et virales. Les protéines de structure ainsi que p7 sont clivées par des peptidases cellulaires alors que les fonctions protéases de NS2 et du complexe NS3-4A prennent en charge le clivage des autres protéines non structurales. Au final, toutes les protéines virales se retrouvent directement ou indirectement associées aux membranes (93) (Figure 6A).

La réplication du génome et l'assemblage des virions se produisent au niveau du RM, où se forment les complexes de réplication (Figure 6A et 6B). Le RM est constitué de vésicules à simples et doubles membranes. L'initiation du réarrangement membranaire serait médié par la protéine NS4B. Cependant, il a été démontré que NS3-4A, NS5A et NS5B étaient aussi impliquées dans la formation du RM, et que leur expression concomitante était requise pour l'édification d'un RM complet. L'utilisation de structures membranaires comme site de réplication a été observée pour tous les virus à ARN de polarité positive étudiés jusqu'à maintenant. On croit qu'une de ses fonctions est de séquestrer l'ARN viral à l'écart des molécules de reconnaissance de motifs associés aux pathogènes telles que RIG-I par l'utilisation de signaux de localisation nucléaire (SLN) contenus dans les protéines virales et leur permettant d'être recrutées aux membranes du RM via des nucléoporines présentes à

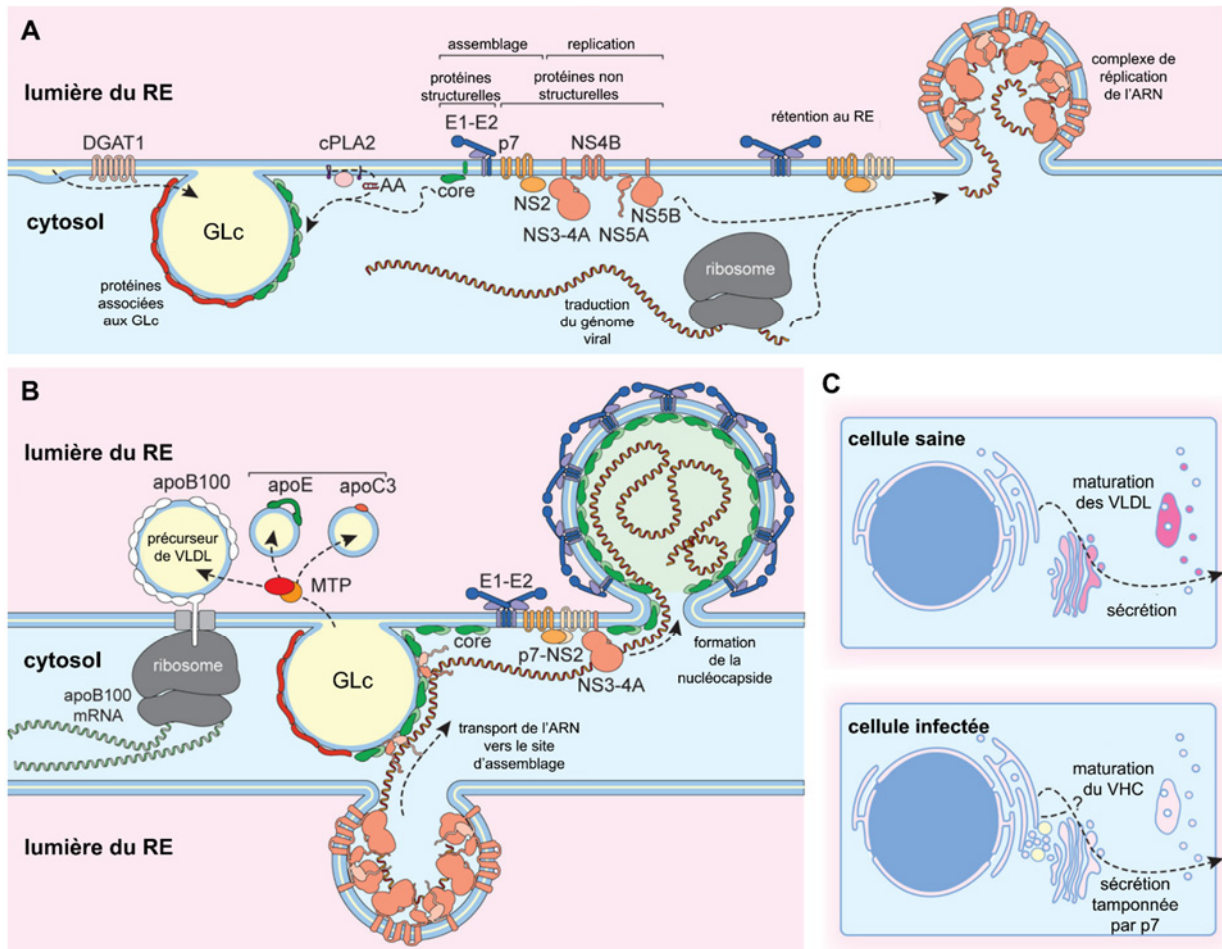
leur surface, empêchant ainsi la reconnaissance du génome viral et l'initiation de réponses immunitaires innées (90, 109-111).

Les protéines virales impliquées dans la réplication du génome du VHC, appelées réplisases, sont les mêmes protéines que celles impliquées dans la formation du RM, soit NS3-4A, NS4B, NS5A et NS5B. Le recrutement des réplisases et leur organisation en complexe de réplication serait effectués avec l'aide de certains facteurs cellulaires tels que l'Annexin A2, impliqué dans l'assemblage de microdomaines membranaires comme les radeaux lipidiques, et hVAP33, une protéine associée aux vésicules (112). Les régions non traduites en 3' et 5' de l'ARN viral agissent à titre de régulateurs de la synthèse par la polymérase NS5B des brins négatif et positif respectivement (113).

### **Assemblage et relâche**

L'assemblage des particules virales permet l'encapsidation du génome du VHC à l'intérieur de la capsidite constituée de plusieurs monomères de la protéine Core ainsi que l'enveloppement des virions qui bourgeonnent dans la lumière du RE (91). Il se déroule à proximité de gouttelettes lipidiques cytosoliques à la surface desquelles sont localisées les protéines Core et NS5A et requiert une coordination spatio-temporelle avec les complexes de réplication, situés dans le RM. La protéine NS5A, avec l'aide de NS3-4A, serait responsable du transport du brin positif du complexe de réplication vers Core associé aux gouttelettes lipidiques. Le complexe p7-NS2 recrute le complexe NS3-4A et leur interaction induit le transport de Core des gouttelettes lipidiques vers les sites de bourgeonnement où l'encapsidation du génome est effectuée. NS3 serait aussi impliquée dans l'encapsidation. Les glycoprotéines d'enveloppe sont aussi recrutées aux lieux d'assemblage par NS2 (93).

Les virions terminent leur maturation et sont relâchés hors de la cellule par la voie de sécrétion. Ils acquièrent à ce moment leur faible densité par contact avec apoE contenu dans les VLDL et HDL. Les protéines d'enveloppe sont aussi modifiées (ajout de N-glycans). On croit que p7 permettrait de protéger E1/E2 ainsi que le virion d'une exposition prématurée à un faible pH en désacidifiant les vésicules sécrétoires et le compartiment lysosomal grâce à sa fonction de canal ionique (93, 114, 115) (Figure 6C).



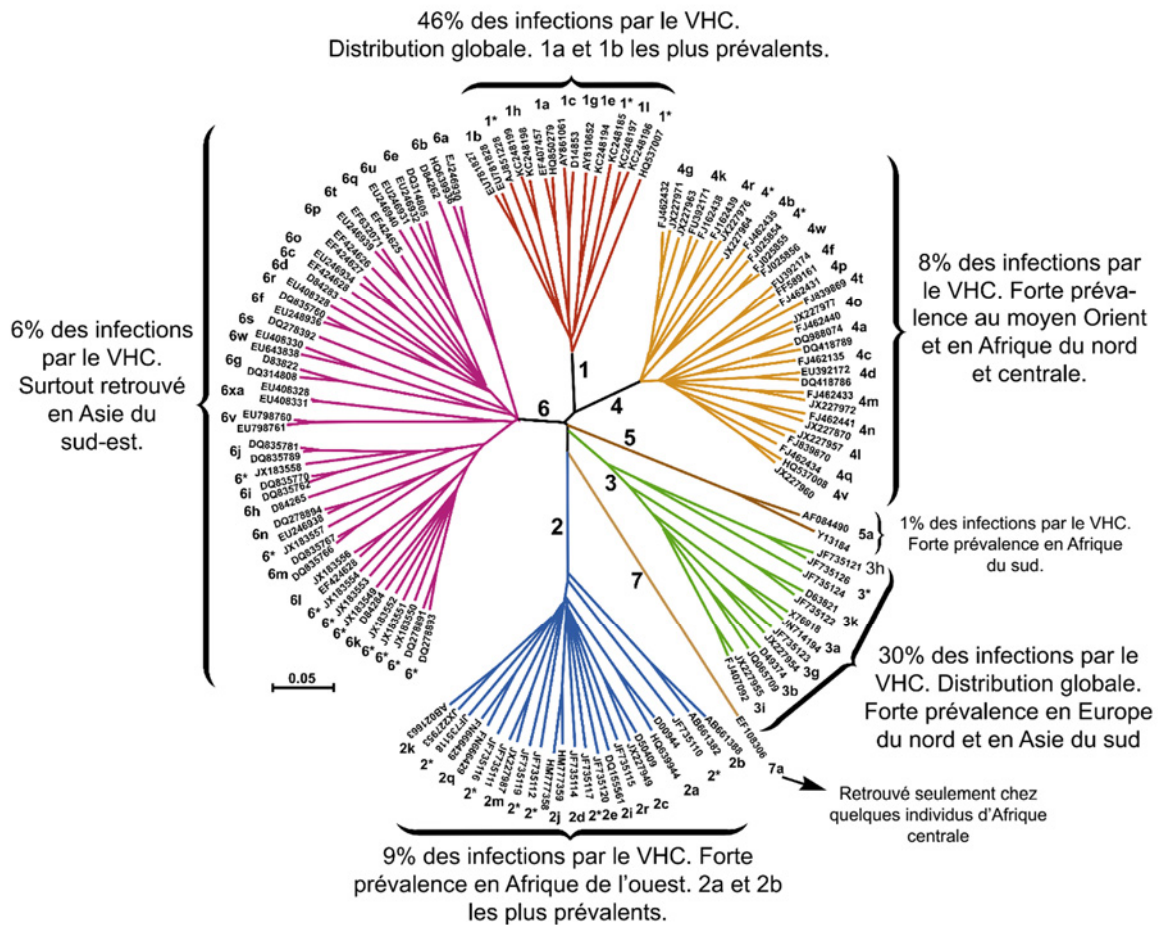
**Figure 6. Réplication, assemblage et relâche du VHC.** A. Traduction des protéines virales et formation du complexe de réplication. B. Transfert du génome viral vers le site d'assemblage et assemblage des virions. C. Sécrétion vésiculaire chez une cellule saine et chez une cellule infectée par le VHC. Tirée et traduite avec permissions de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology, Lindenbach & Rice (93), Copyright (2013).



## 1.6 Diversité génétique du VHC

### 1.6.1 Génotypes et sous-types

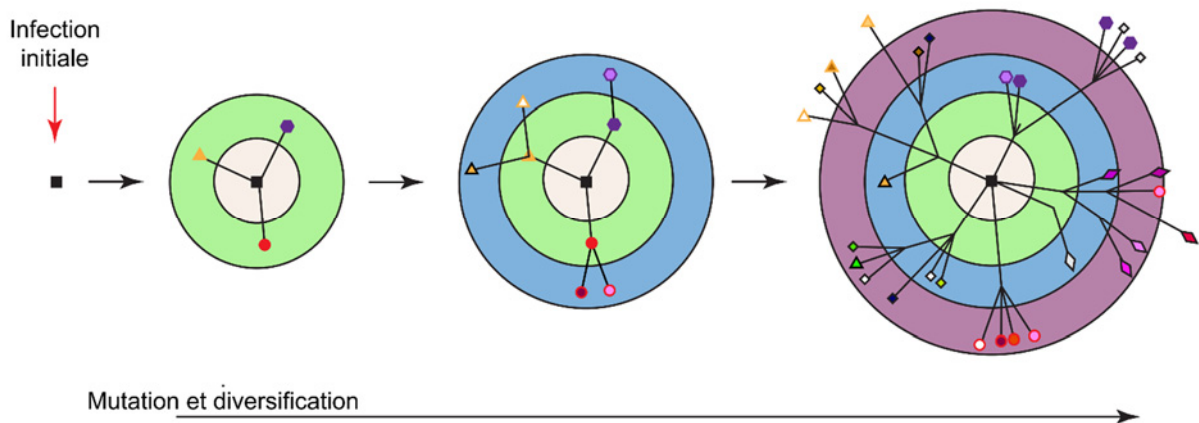
Les virus à ARN sont reconnus pour leur taux de mutation élevé car la polymérase virale, utilisée pour répliquer leur génome, ne possède pas de mécanisme de correction des erreurs (116). Le VHC est l'un des virus à ARN possédant le taux de mutation le plus élevé, de l'ordre de  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  substitutions par site par année (117). Il est divisé en 7 génotypes majeurs et 67 sous-types (62) dont la prévalence varie selon les différentes régions du globe (Figure 7). On observe 31 à 33% de différence génétique entre les génotypes majeurs (118) alors que les sous-types divergent d'au moins 15% (62).



**Figure 7. Génotypes et sous-type du VHC.** Tirée et traduite de Bukh (119) Copyright (2016) avec permissions d'Elsevier.

## 1.6.2 La quasispèce

À l'intérieur même d'un individu infecté, le VHC se présente sous la forme d'un réseau de variantes génétiquement reliées appelé quasispèce (120). Cette particularité confère au VHC une grande capacité d'évolution et d'adaptation face à son environnement, contribuant grandement à la persistance du virus chez l'hôte. Lors de l'infection initiale, la ou les variantes transmises évolueront rapidement générant ainsi un nuage de mutants (Figure 8). Chacune des variantes du réseau possède un « fitness » qui lui est propre. Le terme « fitness » est utilisé pour décrire à quel point un organisme (ici, une variante du VHC) est adapté à son environnement, ce qui se traduit essentiellement par sa capacité à survivre et à se reproduire (121). Ainsi, considéré de manière simpliste, une variante possédant une réplication rapide prendra le pas sur une autre ayant une réplication lente, et ceci se reflètera dans les fréquences relatives de ces deux haplotypes. Un plus grand pouvoir infectieux ou une mutation permettant d'échapper au système immunitaire sont aussi des composantes qui contribueraient à augmenter le fitness. Même une mutation neutre (synonyme, n'entraînant pas de changement dans la séquence protéique) peut influencer le fitness, par exemple si elle bouleverse des structures secondaires de l'ARN requises pour la réplication (122).



**Figure 8. Diversification de la quasispèce du VHC.** Exemple d'évolution d'une quasispèce du VHC. Les cercles concentriques représentent les différents cycles de réplication. La longueur des liens entre les variantes représente la distance génétique entre les variantes. Inspirée de Lauring & Andino (121).

Il faut par contre être conscient que la somme du fitness individuel des variantes ne représente pas nécessairement celui de la quasiespèce. Les variantes du réseau agissent collectivement afin d'absorber les impacts de l'environnement dynamique. Par exemple, une variante possédant un faible fitness individuel peut être maintenue avec une grande fréquence dans la population si sa séquence permet de générer des variantes très adaptées avec un minimum de mutation (séquences voisines avantageuses). À l'opposé, un haplotype possédant un fitness élevé pourrait malgré tout disparaître de la quasiespèce si les mutations potentielles mènent toutes à des phénotypes létaux ou possédant un faible fitness (121). Il est donc en général avantageux pour une quasiespèce d'occuper un large espace de séquence, car plus le nombre d'haplotypes est élevé, plus le nombre de variantes accessibles suite à une mutation est grand, ainsi que la chance de générer un phénotype avantageux permettant d'échapper aux pressions de sélection de l'hôte (116). La composition de la quasiespèce est donc le résultat des séquences présentes à l'origine, de leur potentiel d'évolution (i.e. les séquences voisines potentielles), du fitness individuel des variantes, et de la magnitude et de l'étendue de la réponse immunitaire de l'hôte.

### **1.6.3 Les régions hypervariables**

La variabilité du VHC n'est pas répartie uniformément sur les différentes régions du génome. La majeure partie de sa diversité génétique est retrouvée au niveau de la protéine d'enveloppe E2, plus particulièrement dans les régions hypervariables, pouvant avoir jusqu'à 80% de différence dans leur séquence entre les différents génotypes de VHC (83). Leur diversité, en ordre décroissant serait : HVR1 > HVR3 > HVR2 > igVR (74, 76). HVR1 n'est pas nécessaire au repliement et à la structure générale de l'hétérodimère E1/E2, ce qui pourrait expliquer sa diversité plus élevée que celle d'HVR2 et d'igVR, deux régions requises pour l'hétérodimérisation d'E1 et d'E2, et pour la liaison au CD81 (123). On croit aussi qu'HVR1 camouflerait des épitopes conservés à l'intérieur d'E2, entravant ainsi la réponse neutralisante (100, 123) et coopérerait avec HVR2 pour cacher le site de liaison à CD81 (124). HVR1 a pourtant une implication démontrée dans l'infectivité des virions via son interaction avec SRB1 et sa modulation du contenu en lipoprotéines des particules lipovirales (100, 101). Bien que très hétérogène dans sa séquence primaire, les charges positives ainsi

que sa conformation générale seraient conservées et joueraient un rôle dans l'infection (125, 126). Aucune donnée concernant la fonction d'HVR3 dans l'histoire naturelle du VHC n'est encore disponible mais cette région est sous forte pression de sélection (76).

#### **1.6.4 Modalités d'étude de la quasiespèce**

Plusieurs informations peuvent être tirées de l'étude de la quasiespèce. Cette dernière nous informe du niveau de diversité génétique des populations virales présentes, des pressions de sélection exercées sur les régions du génome du VHC étudiées et sur la succession des variantes composant la quasiespèce au fil du temps.

##### **La diversité**

Elle dépend du nombre de variantes (la richesse, N) et de leurs fréquences relatives (la répartition ou entropie) et nous informe sur le niveau de complexité de la quasiespèce. Intuitivement, une population constituée de plusieurs variantes sera considérée comme plus diversifiée qu'une population formée d'une seule variante. Pour deux populations ayant le même nombre de variantes, la répartition de leurs fréquences relatives influencera le niveau de diversité. Par exemple, une population constituée de cinq variantes ayant chacune une fréquence relative de 0.2 sera considérée comme plus diversifiée qu'une dans laquelle les fréquences relatives des cinq variantes seraient très différentes (une variante très majoritaire et 4 variantes rares par exemple). L'entropie de Shannon ( $H'$ ) est couramment utilisée pour estimer la diversité d'une population. Elle est calculée selon la formule :  $H' = -\sum_{i=1}^N p_i \ln p_i$ , où p est la proportion de la quasiespèce représentée par une variante i, et N est la richesse de la population. Il est aussi possible de normaliser  $H'$  pour éliminer l'influence de la richesse et obtenir une mesure d'entropie pure. On divise alors  $H'$  par la diversité maximale possible, soit  $\ln(N)$ . La valeur obtenue sera ainsi comprise entre 0 et 1 (127).

##### **Les pressions de sélection**

L'étude de la quasiespèce permet de déceler la présence de pressions sélectives appliquées sur le virus. Pour ce faire, on compare le taux de substitutions synonymes par site synonyme (dS) au taux de substitutions non-synonymes par site non-synonymes (dN). Si  $dN = dS$ , on peut alors conclure que la diversité observée est le résultat d'une dérive génétique lié au taux de mutation et non à une pression de sélection. À l'opposé, un  $dN > dS$  indique

que la majorité des substitutions nucléotidiques entraînent un changement d'acide aminé, ce qui témoigne d'une pression sélective positive pouvant par exemple sélectionner des variantes d'échappement. Finalement, un  $dN < dS$  témoigne d'une pression de sélection négative (aussi appelé purificatrice). Dans ce cas, on observe la disparition des variantes ayant un phénotype délétère (128).

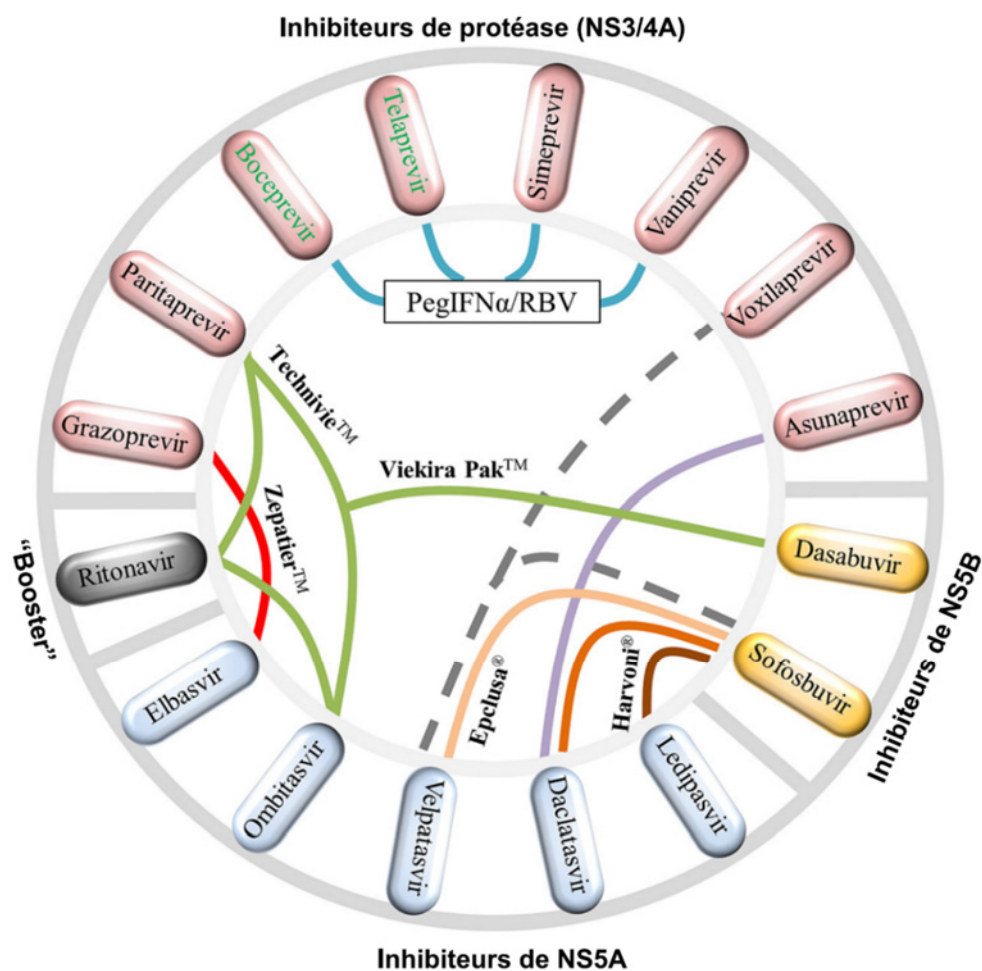
### **La similarité**

Lorsqu'on a la chance d'avoir des échantillons prélevés de façon longitudinale, il est intéressant d'étudier l'évolution de la composition de la quasiespèce dans le temps. Pour ce faire, il est possible de comparer la quasiespèce entre différents échantillons à l'aide de l'indice de Morisita-Horn. Ce dernier calcule la similarité de deux populations en termes d'espèces partagées et de leurs fréquences relatives. Deux échantillons constitués exactement des mêmes espèces en proportions identiques auront ainsi un indice de similarité de 1 alors que deux échantillons ne partageant aucune espèce auront une similarité de 0 (129).

## **1.7 Traitements**

Les traitements contre le VHC ont beaucoup évolué dans les 2 dernières décennies. Au début des années 90, la thérapie impliquait un traitement par l'interferon- $\alpha$  (IFNA) recombinant en mono-thérapie qui s'est montrée peu efficace (<10% de guérison) et accompagnée d'effets secondaires importants (130). Ensuite, la combinaison d'IFNA et de ribavirine (RBV) démontra des taux de guérison de 34 à 42%, et le remplacement de l'IFNA par sa forme pegylée (peg-IFNA) toujours en combinaison avec la RBV entraîna des taux de guérison variables (45-80%) selon le génotype du VHC (131, 132). Ce dernier traitement fut le standard jusqu'en 2011, date à laquelle les premiers antiviraux à action directe (DAA) furent mis sur le marché : le télaprévir et le bocéprévir, deux inhibiteurs de la protéase virale NS3/4A, utilisés en combinaison avec le traitement standard. Ces deux traitements, bien qu'ayant des taux d'efficacité respectables de 70-80%, n'étaient efficaces que pour les infections par le génotype 1 du VHC (133-135). À partir de 2013, on assiste à l'émergence de plusieurs DAA utilisés en combinaison avec le traitement standard, avec RBV seulement, puis en régime sans IFNA ni RBV et en différentes combinaisons de DAA (Figure 9) (136).

Ils consistent en 3 classes d'inhibiteurs : inhibiteurs de NS3/4A, inhibiteurs de la polymérase virale NS5B et inhibiteurs de NS5A. Plusieurs de ces combinaisons de médicaments ont été approuvés par la U.S. Food & Drug Administration (FDA) et démontrent des taux de guérison frochant les 100% pour tous les génotypes du VHC (136, 137).



**Figure 9. Illustration schématique des différentes combinaisons de DAA.** Les lignes de couleur représentent 13 combinaisons de DAA : 1) boceprevir (Victrelis®) + pegIFNA/RBV. 2) telaprevir (Incivek®) + pegIFNA/RBV. 3) sofosbuvir (Sovaldi®) + pegIFNA/RBV. 4) simeprevir (Olysio®) + pegIFNA/RBV. 5) ledipasvir + sofosbuvir (Harvoni®). 6) ombitasvir + paritaprevir + ritonavir + dasabuvir (Viekira Pak™). 7) ombitasvir + paritaprevir ritonavir (Technivie™). 8) daclatasvir (Daklinza™) + sofosbuvir (Sovaldi®). 9) elbasvir + grazoprevir (Zepatier™). 10) sofosbuvir + velpatasvir (Epclusa®). 11) vaniprevir (Vanihep®) + pegIFNA/RBV. 12) asunaprevir (Sunvepra®) + daclatasvir (Daklinza®). 13) voxilaprevir + velpatasvir + sofosbuvir. Les combinaisons 1 à 10 ont été approuvées par la FDA et peuvent être utilisées avec ou sans RBV. Les combinaisons 11 et 12 sont approuvées au Japon et la combinaison 13 est actuellement évaluée par la FDA. Le boceprevir et le telaprevir (en vert) ont été discontinués. Tirée et traduite de Li et al (136) avec permission d'Elsevier.

## **Chapitre 2 : Le VHC chez la femme enceinte et l'enfant**

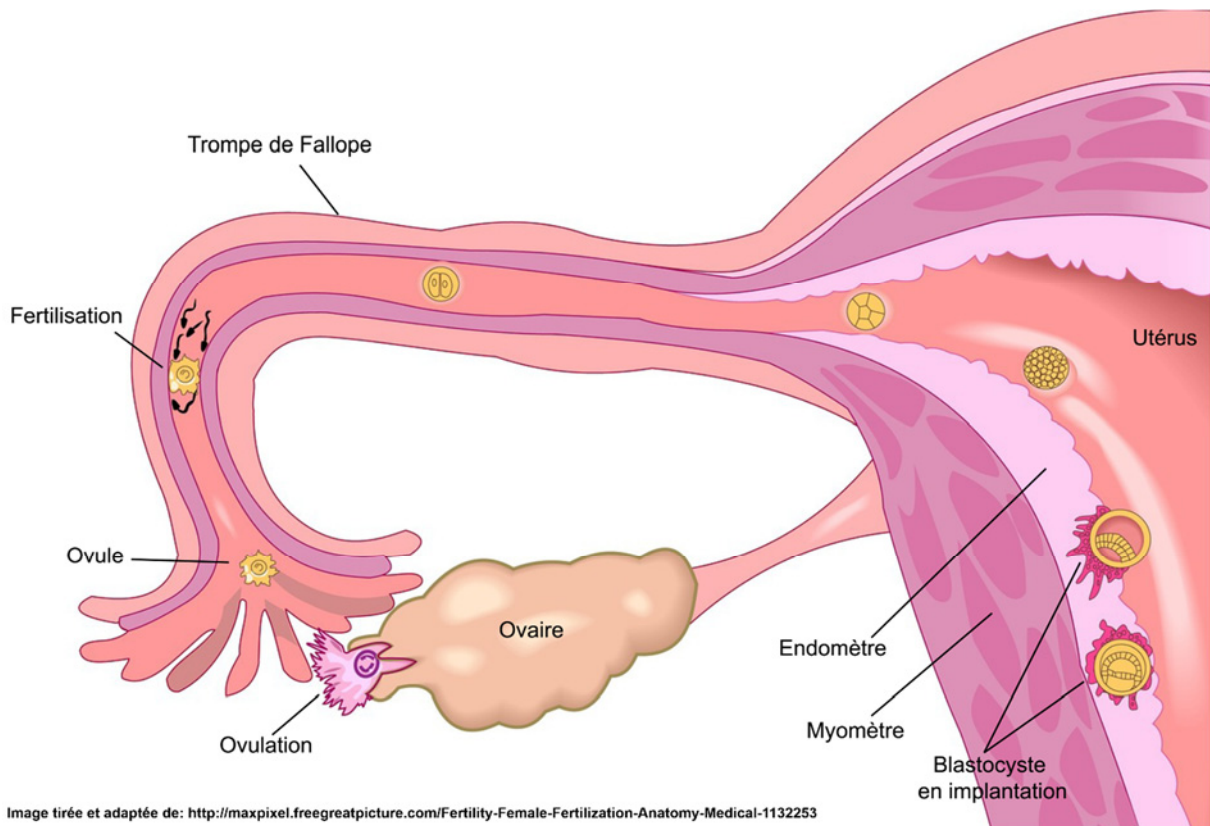
### **2.1 Particularités de la grossesse**

La grossesse est un évènement unique auquel on doit la survie de notre espèce. Cet environnement est dynamique et en constante évolution. Les différentes phases de la gestation comportent chacune des particularités anatomiques et immunologiques. Afin de bien comprendre l'interaction que pourrait avoir le VHC avec cet environnement particulier, il est important d'introduire les différentes phases de la grossesse, leur ordre chronologique, les molécules et cellules immunitaires impliquées ainsi que leur régulation.

#### **2.1.1 L'implantation**

Le blastocyste s'implante dans l'endomètre (Figure 10) environ 7 à 9 jours après la fertilisation. Il est constitué d'une masse cellulaire interne, laquelle se développera en embryon, recouverte d'une couche de trophoblastes constituant le trophoctoderme, qui donnera naissance au placenta (Figure 11) (138).



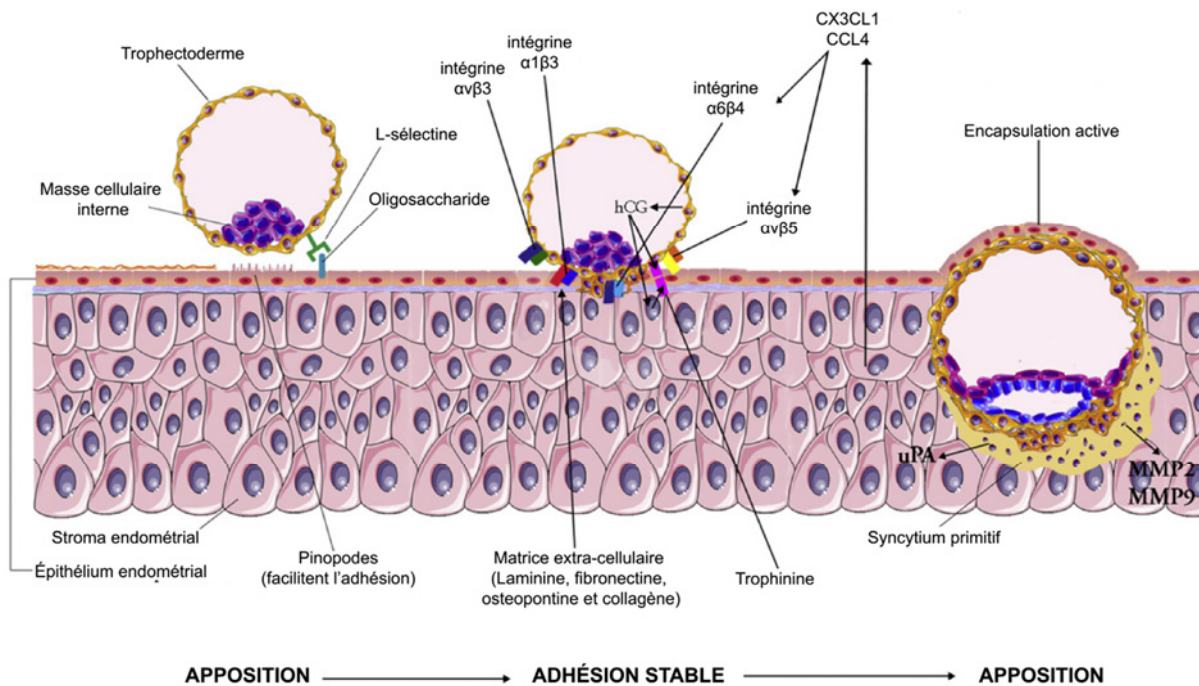


**Figure 10. Représentation schématique de l'utérus.** Image Libre de droits d'auteur.

Le processus d'implantation consiste en trois phases : l'apposition, l'adhésion stable et l'invasion. L'apposition est l'attachement initial de faible affinité du blastocyste à l'épithélium endométrial. Elle implique la L-sélectine, exprimée par les cellules du trophoctoderme qui lierait des oligosaccharides à la surface de l'épithélium (139, 140). Des pinopodes, structures présentes à la surface des cellules épithéliales, faciliteraient aussi l'attachement initial du blastocyste (141). Cette première étape de l'implantation activerait des voies de signalisation menant à l'activation des intégrines qui seront importantes dans l'adhésion stable (Figure 11) (138). Outre les intégrines, des molécules de trophinine, dont l'expression par les cellules stromales maternelles est induite par la production de l'hormone hCG (human chorionic gonadotrophin), faciliteraient plus encore l'adhésion stable du blastocyste (142). L'adhésion semble induire une certaine activation du trophoctoderme via la trophinine, et le passage subséquent vers la phase d'invasion. Quoi qu'il en soit, suite à l'adhésion stable du blastocyste, on observera deux lignées de trophoblastes dérivées du trophoctoderme : les cytotrophoblastes (CTB), cellules mononucléées et les



syncytiotrophoblastes (STB), cellules multinucléées formant un syncytium. Ce dernier sécrèterait des enzymes qui digèreraient l'endomètre permettant ainsi l'invasion du tissu par le blastocyste (Figure 11), notamment des métalloprotéinases (MMP-2 et 9) (143). L'épithélium endométrial est finalement reformé par dessus le blastocyste qui se retrouve alors encapsulé dans la paroi utérine (138).



**Figure 11. Implantation du blastocyste dans l'endomètre.** Tirée et traduite de James et. al (138) avec permissions d'Elsevier.

## 2.1.2 La décidualisation

La décidualisation est un phénomène par lequel l'endomètre est conditionné afin de se préparer à la grossesse. Elle implique la transformation des cellules stromales endométriales en cellules déciduales sécrétrices, le remodelage de la vasculature utérine et le recrutement de cellules immunitaires spécifiques (144). Elle est essentielle à l'implantation de l'embryon et au développement placentaire (138). Chez l'humain, la décidualisation se produit de façon cyclique (cycle menstruel) indépendamment de la grossesse. À l'opposé,

chez la souris, la décidualisation ne se produit que s'il y a implantation d'un blastocyste (145).

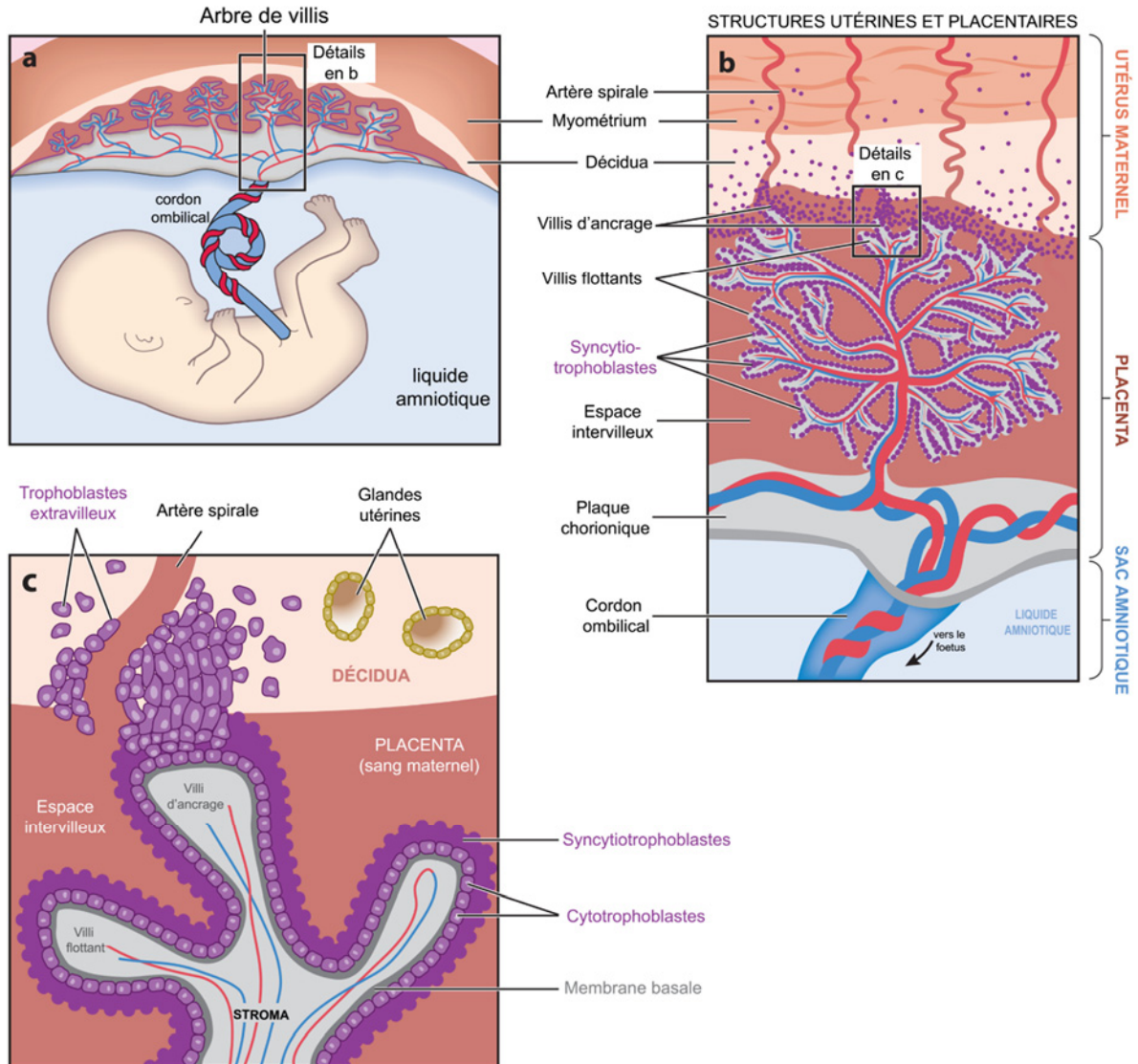
Les cellules stromales endométriales (CSE) avant décidualisation ont un phénotype de type fibroblastes (de forme allongée). Suivant les menstruations, les CSE entrent en phase de prolifération afin de régénérer l'endomètre. Après l'ovulation, les CSE vont progressivement se différencier et acquérir un phénotype complètement différent : elles deviennent plus grosse (augmentation du cytoplasme) et arrondies, et sécrèteront plusieurs substances (cytokines, hormones et plusieurs autres molécules), qui sont relâchées dans la matrice extracellulaire (MEC) (144). La décidualisation débute environs 9 jours après l'ovulation au niveau des CSE se trouvant à proximité des artères spirales (vasculature de l'endomètre) (146), et est principalement dirigée par les voies de signalisation de l'AMP cyclique (initiation) et de la progestérone (maintien) (144). Suite à leur transformation, les CSE de l'endomètre, qu'on appellera maintenant la décidua, seront en mesure d'orchestrer plusieurs événements essentiels au succès de la grossesse tels que contrôler l'invasion de la décidua par les trophoblastes et freiner la réponse immunitaire maternelle locale en réponse aux antigènes paternels exprimés par le foetus (146).

La décidualisation implique aussi des changements dans la composition en cellules immunitaires présentes dans la décidua. De 3 à 5 jours suivant l'ovulation, on observe une augmentation importante du nombre de cellules NK utérines (uNK) qui, au premier trimestre de grossesse représenteront 70% des cellules immunitaires de la décidua. Les macrophages représenteront approximativement 20% des leucocytes et les lymphocytes T (LT) de 10 à 20%. On retrouvera aussi des cellules dendritiques (DC) (1%) et quelques rares lymphocytes B (LB) (144, 147). La présence de ces cellules est essentielle au bon déroulement de la grossesse.

La vasculature utérine subit d'importants changements en préparation et pendant la grossesse afin d'assurer un débit sanguin adéquat permettant à l'utérus, au placenta et au fœtus de se développer normalement. Les vaisseaux sanguins s'allongent en réponse à l'épaississement de l'endomètre, leur diamètre s'agrandit et leur paroi s'amincit (148). Les cellules uNK joueraient un rôle critique dans le remodelage des artères spirales (146). La vasculature utérine sera aussi modifiée par l'invasion des trophoblastes, qui iront se substituer aux cellules endothéliales des artères spirales (148).

### 2.1.3 La placentation

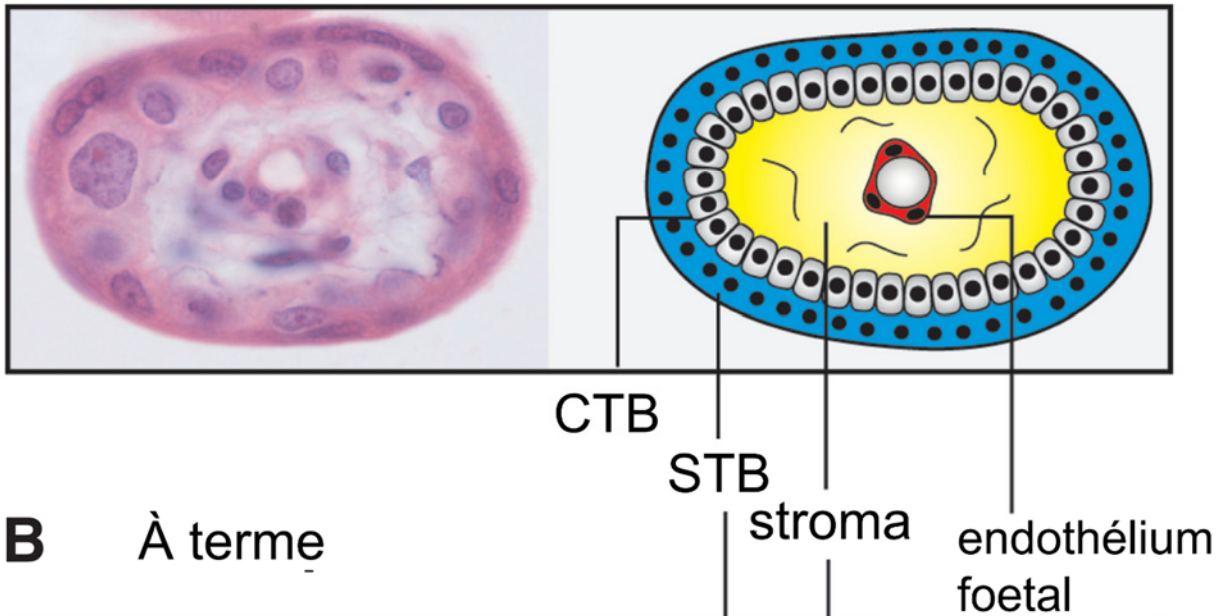
Le placenta est un organe unique car il n'est présent que pendant la grossesse (149). Il agit comme un filtre, laissant sélectivement passer nutriments et oxygène vers le fœtus tout en empêchant le contact direct entre les flux sanguins de la mère et de l'enfant. Chez l'humain, le placenta est formé de villis qui trempent littéralement dans le sang maternel (placenta de type hémochorial) (Figure 12) (150-152). Le développement des villis commence à la 2<sup>ème</sup> semaine de grossesse. À partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de grossesse, les villis formés sont complets : ils sont recouverts d'une couche de CTB mononucléés et d'un syncytium de STB et contiennent les vaisseaux sanguins fœtaux (Figure 12c). À cette étape, aucune connection entre l'espace intervilloux et l'artère spirale n'est établie. Ce n'est qu'à partir de 10 à 12 semaines de grossesse que le sang maternel remplira l'espace intervilloux et entrera en contact avec les STB (138).



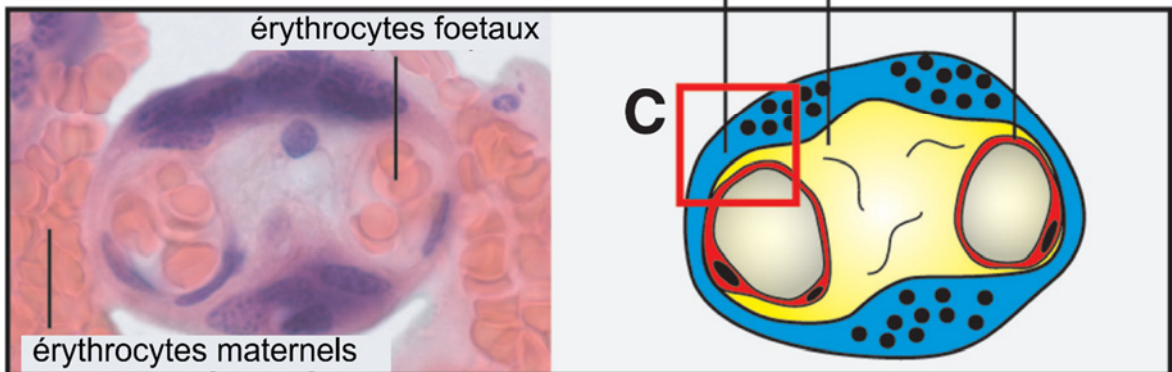
**Figure 12. Représentation schématique des structures placentaires chez l'humain en début de grossesse.** A. Environnement intrautérin. On y retrouve l'utérus maternel constitué du myométrium et de la décidua. Les structures embryonnaires incluent le placenta et le cordon ombilical (constitué de deux artères et une veine ombilicals), qui transfère le sang entre le placenta et le fœtus. Ce dernier est entouré par le fluide amniotique. B. Le placenta est constitué de villis flottants et d'ancrage. Il est bordé par la plaque chorionique suivi du cordon ombilical. L'utérus maternel comprend le myométrium, la décidua et les artères spirales. C. Aperçu d'un arbre de villis. Les caractéristiques maternelles présentées ici comprennent la décidua, les glandes utérines, l'artère spirale et l'espace intervilloux (qui est rempli du sang maternel). Les trophoblastes extravilloux (EVT) envahissent et ancrent le placenta dans la décidua (aussi jusqu'au premier tiers du myométrium). Les structures embryonnaires comprennent le villi flottant et le villi d'ancrage. Les STB recouvrent l'arbre de villis et sont en contact direct avec le sang maternel. Les CTB sont retrouvés entre les STB et la membrane basale. Dans le présent schéma on retrouve une couche continue de CTB ce qui représente la couche de CTB en début de grossesse. Figure tirée et traduite de Delorme-Axford et. al (151).

On retrouve 2 types de villis : les villis d'ancrage et les villis flottants. Les villis d'ancrage, comme leur nom l'indique, servent à ancrer le placenta dans la décidua et le font via l'invasion de la décidua et de la paroi des artères spirales par les trophoblastes extravillieux (EVT) qui forment des colonnes de cellules au bout des villis d'ancrage (153). Les EVT sont donc en contact avec les cellules de la décidua ainsi qu'avec le sang maternel. Les villis flottants flottent librement dans le sang maternel remplissant l'espace intervillieux (Figure 12c) (151). L'espace de contact entre les tissus fœtaux et maternels est appelé interface materno-fœtale (IMF). La partie plus profonde des villi d'ancrage ainsi que les villi flottants (non ancré dans la décidua) sont baignés par le sang maternel. Les STB constituent la couche externe des villi et sont en contact direct avec le sang maternel. Recouverts de microvillis maximisant la surface d'échange, ils assurent le transport des nutriments et des gaz entre la mère et le fœtus (149). En début de gestation, on retrouve une couche continue de CTB sous-jacente aux STB. Ce sont des cellules mononucléées indifférenciées qui renouvellent constamment la couche de STB en fusionnant (figure 13A) (154, 155). Plus la grossesse avance et plus la couche de CTB devient diffuse, ne laissant que très peu de CTB sous la couche de STB dans le placenta à terme (Figure 13B). À l'intérieur des villi se trouvent les vaisseaux sanguins fœtaux formés de cellules endothéliales (154). On y retrouve aussi des macrophages placentaires appelés cellules de Hofbauer dont les fonctions exactes restent encore inconnues (156).

## A 1er trimestre



## B À terme



**Figure 13.** Architecture de l'extrémité d'un villi placentaire A. au premier trimestre de grossesse et B. dans le placenta à terme. Tirée et traduite de Fuchs et. al (154) avec permissions de John Wiley and Sons.

### 2.1.4 La tolérance materno-fœtale

La grossesse est un état immunologique particulier où une fine balance entre la tolérance materno-fœtale aux antigènes paternels et la protection de la mère et de l'enfant face aux pathogènes doit être maintenue. Le système immunitaire de la femme enceinte est un joueur clé dans l'établissement, le maintien et le succès d'une grossesse saine.

On a longtemps pensé que le système immunitaire de la femme enceinte était en quelque sorte supprimé, prévenant ainsi le rejet du fœtus et expliquant la plus grande susceptibilité à certaines infections. Pourtant, des études ont démontré que l'ablation des cellules immunitaires de la décidua résultait en un arrêt de la gestation (157). Il est vrai que l'enfant à naître exprime 50% d'antigènes paternels, ce qui est comparable à une semi allogreffe. Alors comment se fait-il que l'immunité maternelle fonctionnelle ne résulte pas en rejet du fœtus mais plutôt en une tolérance?

Tout d'abord, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées par les trophoblastes sont tolérogènes plutôt qu'immunogènes. HLA-A et HLA-B, deux molécules du CMH de classe I (CMH-I) responsables du rejet de greffe, ne sont pas exprimées par les trophoblastes (147, 158). Ces derniers expriment plutôt HLA-E et HLA-G, deux molécules du CMH-I non conventionnelles induisant respectivement la tolérance et la modulation des réponses des NK, des LT, des LB et des DCs. Aucun CMH-II n'est exprimé par les trophoblastes (147, 159). Ainsi, bien que les antigènes paternels soient reconnus par les cellules immunitaires maternelles, cela n'entraîne pas de réponse cytotoxique délétère. Les trophoblastes expriment aussi HLA-C, qui lierait les récepteurs KIR (Killer-cell immunoglobulin-like receptor) des uNK et jouerait un rôle dans l'invasion de la décidua par les EVT. HLA-C interagirait aussi avec les LT de la décidua mais n'entraînerait pas de réponse délétère (160). La production de TGF- $\beta$ 1 et de galectin-1 par les CSE et les uNK entraînerait un état tolérogène des DC, lesquelles produiraient plus d'IL-10, moins d'IL-12 et exprimeraient peu de molécules de co-stimulation (161, 162). La production de galectin-1 par les uNK entraînerait aussi l'apoptose des LT activés (163).

Un autre mécanisme impliqué dans la tolérance materno-fœtale implique une répression de l'immunité à médiation cellulaire par un débalancement de la réponse T auxiliaire (Th) vers un phénotype Th2 favorisant une immunité humorale (147). Cet effet est observé plus fortement à l'IMF mais a aussi des répercussions sur l'immunité systémique (164, 165). Les cellules Th2 sont attirées et s'accumulent à l'IMF via la sécrétion, entre autre, de l'hCG par le blastocyste après la fertilisation et de la prostaglandine D2 par le placenta et agissant comme chemoattractants. Les DC utérines peuvent aussi induire un phénotype Th2 chez les LT naïfs (164, 166, 167). La production d'IL-10, d'IL-4, et d'IL-13 par la décidua et les trophoblastes contribue aussi à créer un environnement où la réponse Th2 est favorisée

par rapport à la réponse Th1. L'oestradiol et la progestérone sont aussi impliqués dans la promotion de la réponse Th2 (147). En plus d'inhiber les Th1 et les macrophages, les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-4 inhibent le début du travail avant que le fœtus ne soit prêt à être mis au monde. Le début de la parturition est d'ailleurs caractérisé par le retour à un environnement placentaire pro-inflammatoire (157, 168-170).

Les cellules T régulatrices (Tregs) auraient aussi un rôle clé dans l'implantation du blastocyste et dans le maintien de la tolérance materno-fœtale (171, 172). Ils suppriment les LT auto-réactifs via la production d'IL-10 et de TGF $\beta$ . Leur nombre est augmenté pendant la première moitié de la grossesse puis diminue jusqu'à atteindre des niveaux normaux à terme (147). Certaines données suggèrent que les Tregs sont spécifiques des antigènes paternels, ce qui protégerait le fœtus d'une attaque immunitaire maternelle (173).

Ainsi, le système immunitaire de la femme enceinte n'est pas du tout supprimé comme on l'a longtemps cru : il est essentiel au déroulement d'une grossesse saine, il est actif mais rigidement contrôlé. Une communication adéquate entre le système immunitaire maternel et les signaux envoyés par l'unité placent-fœtale est essentielle et modulera la manière dont la femme enceinte réagira à certains pathogènes afin de garantir une protection contre ces derniers sans toutefois endommager le fœtus (157).

### **2.1.5 Progression de la grossesse et environnement pro- ou anti-inflammatoire**

La gestation est un phénomène en constante évolution. L'implantation du blastocyste, l'invasion de la décidua par les trophoblastes et le remodelage des vaisseaux sanguins induit un environnement contenant des cellules invasives, d'autres qui meurent et d'autres qui réparent. Cela est similaire à une blessure et un environnement plutôt pro-inflammatoire doit être maintenu pour s'assurer de l'enlèvement des débris et une réparation de l'épithélium décidua (174). C'est d'ailleurs ce phénomène qui entraîne les nausées ressenties par la femme enceinte. Le premier trimestre de grossesse est donc une phase « pro-inflammatoire » (157). Le second trimestre de grossesse est une phase de croissance et de développement fœtal intense et est caractérisé par le développement d'un environnement anti-inflammatoire. Finalement, en fin de gestation, le retour de l'inflammation est essentiel pour induire le travail



et expulser l'enfant et le placenta (147, 157). On observe à ce moment une infiltration importante de cellules immunitaires dans le myomètre, ce qui contribue au processus inflammatoire (175).

## **2.2 Pathogenèse du VHC chez la femme enceinte et l'enfant**

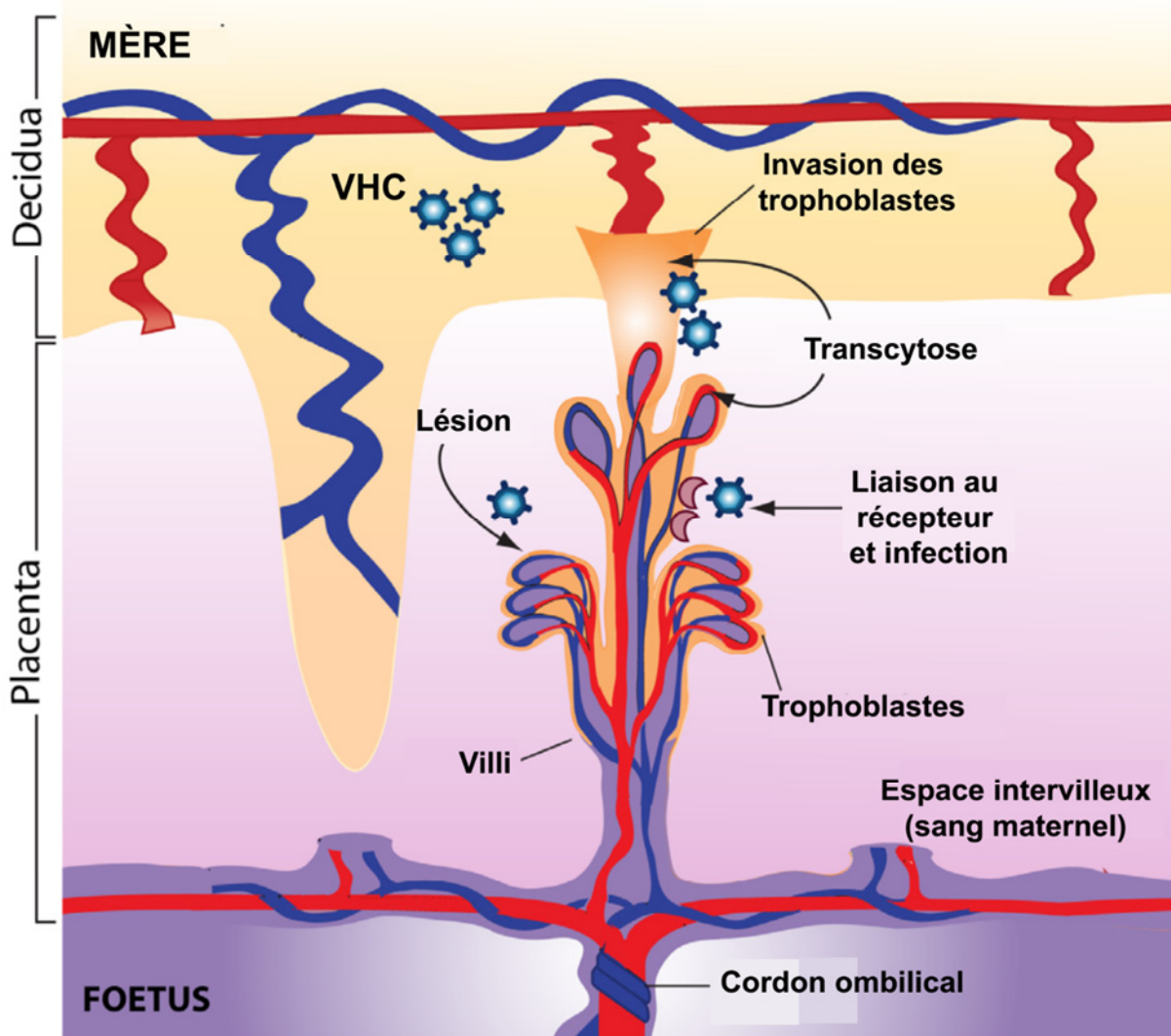
La grossesse est un environnement immunitaire unique et changeant, il est donc concevable que cet état ait une influence sur le cours de l'infection à VHC. Il a été observé dans une cohorte de 266 femmes enceintes infectées par le VHC une plus grande proportion de femmes présentant des niveaux d'ALT élevées en début de grossesse (56%) par rapport au 3<sup>ème</sup> trimestre (7%). On observait ensuite un retour à des niveaux d'inflammation hépatique élevés dans les 6 mois suivant l'accouchement chez 55% des patientes (176). Gervais et al ont obtenu des résultats similaires en étudiant une cohorte de 26 femmes enceintes (177). Certaines études ont également rapporté une augmentation de la charge virale du VHC au cours de la grossesse, les valeurs les plus élevées étant atteintes au 3<sup>ème</sup> trimestre. Chez certaines femmes, on a observé ensuite un déclin rapide de la charge virale du VHC quelques mois après l'accouchement (177-179). Cette variation de la charge virale observée pendant la grossesse contraste avec la relative invariabilité de ce paramètre chez les femmes non enceintes chroniquement infectées par le VHC (180). Ces fluctuations pourraient être reliées aux différentes phases de la grossesse et à leur caractéristiques immuologiques spécifiques : l'inflammation plus élevée en début de grossesse résulterait de l'environnement pro-inflammatoire caractéristique du premier trimestre et d'une réponse à médiation cellulaire n'ayant pas encore été modulée. Cette dernière contrôlerait la charge virale via la destruction des hépatocytes infectés et la relâche des marqueurs d'inflammation. L'établissement de la tolérance materno-fœtale et d'un environnement anti-inflammatoire pendant les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres de grossesse expliqueraient pour leur part la diminution de l'inflammation et l'augmentation de la charge virale (181, 182). Le retour à la normale de l'immunité Th1 dans la période post partum entraînerait alors une baisse importante de la charge virale et un rebond de l'inflammation hépatique (183). Dans une cohorte de 22 femmes enceintes infectées par le VHC, on a même observé la clairance spontanée de l'infection chronique en post partum chez 2 patientes (184). Une étude plus récente a révélé

que la clairance spontanée observée chez certaines femmes en post partum était associée avec le polymorphisme favorable du gène IL28B (185). En contradiction avec ces explications, le fait que la relative suppression de la réponse Th1 se produit à l'IMF ne devrait pas affecter l'immunité systémique (164).

Bien que la majorité des grossesses de femmes infectées par le VHC se déroulent sans encombre, certaines études ont rapporté des risques de complications plus élevés dans cette population. On dénote un plus grand risque de rupture prématurée des membranes, de diabète gestationnel, d'accouchement prématuré et de faible poids de l'enfant à la naissance (186-189).

## **2.3 Transmission verticale du VHC**

Le VHC peut être transmis de la mère à l'enfant pendant la grossesse ou l'accouchement. C'est la principale cause d'infection pédiatrique. On ne connaît toutefois pas les mécanismes ou routes utilisées par le virus pour traverser la barrière placentaire et s'établir chez l'enfant. La TV du VHC semble assez inefficace puisqu'elle ne se produit qu'à une fréquence d'environ 10% (190) et ce, malgré qu'on estime à  $10^{13}$ - $10^{14}$  le nombre de virions passant par le lit placentaire pendant les neuf mois de grossesse (191). L'ARN du VHC a rarement été détecté dans le liquide amniotique, ce qui suggère que la TV se produit plutôt à travers le placenta (192). Plusieurs hypothèses ont été avancées en ce qui a trait à la manière dont le VHC traverserait la barrière placentaire (Figure 14). On croit que le VHC pourrait soit infecter directement les trophoblastes, qui expriment plusieurs récepteurs impliqués dans son entrée (154, 193-197), soit être transporté à travers les couches de trophoblastes par des mécanismes de transport de nutriments ou via le transfert passif des anticorps maternels (transcytose) (154) et finalement via des microhémorragies causées par des lésions et permettant au sang maternel d'entrer dans la circulation fœtale (190).



**Figure 14. Voies hypothétiques de transmission verticale du VHC.** Tirée et traduite de Le Campion et al. (190)

Parmi les facteurs de risques identifiés dans la TV du VHC on retrouve la charge virale VHC (198), la détection de l'ARN du VHC dans les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) de la mère (199, 200), la coinfection de la mère par le VHC et le VIH-1 (201-203) et une inflammation hépatique élevée (204, 205). La rupture prolongée des membranes ainsi que l'amniocentèse sont aussi des facteurs de risque ayant été identifiés par certains (203) mais pas par d'autres (206).

Il n'y a pas de seuil de charge virale précis permettant de déterminer si la TV du VHC aura lieu (198). Par contre, elle est essentiellement observée chez les patientes présentant une charge virale détectable (182). Il semble donc qu'une question de dose soit impliquée dans

la TV du VHC, avec un risque de transmission qui augmente avec la quantité de virus circulants.

Bien que le VHC soit principalement hépatotrophique, sa détection dans des compartiments extrahépatiques comme les PBMC a souvent été rapportée (207) et a été associée à un plus grand risque de TV (199, 200). Bien que la réplication active du VHC n'ait pas systématiquement été observée (détection du brin négatif), on pense que le virus pourrait diffuser librement dans les PBMC (208) ou être simplement attaché à leur surface (209). Des cellules maternelles sont fréquemment retrouvées dans la circulation sanguine de l'enfant (microchimérisme maternel) (210). Elles pourraient donc, en théorie, servir de véhicule au VHC pour traverser la barrière placentaire.

En absence de traitement antirétroviral administré à la femme enceinte coïnfectée par le VIH-1, le taux de TV du VHC peut tripler (211). Bien qu'on ne sache pas exactement comment la présence d'une infection par le VIH-1 faciliterait la TV du VHC, on croit que cela pourrait être dû à la fragilisation de la barrière placentaire par le VIH-1, ou la facilitation par le VIH-1 de l'infection des PBMC par le VHC (190, 212). Cependant, l'administration d'un traitement antirétroviral permettant de contrôler la charge virale du VIH-1 pendant la grossesse ramène le taux de TV du VHC des femmes coïnfectées à des niveaux similaires aux patientes infectées par le VHC seulement (211).

On sait peu de choses sur le moment où la TV du VHC se produit et sur la fraction de la quasiespèce transmise à l'enfant (goulot d'étranglement). Dans le cas du VIH-1, la TV se produit près du moment de l'accouchement (péripartum) dans la plupart des cas, vu l'efficacité de la césarienne élective à réduire le taux de TV même en absence de traitement antirétroviral (213), et implique un goulot d'étranglement très serré (une seule ou très peu de variantes sont transmises à l'enfant) (214). Dans le cas du VHC, l'efficacité limitée de la césarienne élective à diminuer le risque de TV (182) et la détection de charges virales VHC significatives chez certains enfants à, ou peu de temps après la naissance (215) suggèrent que la transmission in utero pourrait être courante. Finalement, les équipes de recherche ayant examiné la quasiespèce du VHC chez les enfants infectés verticalement ont révélé une faible diversité de quasiespèce, suggérant que la TV du VHC impliquerait peu de variantes comme dans le cas du VIH-1 (216-218).

## **2.4 Traitements de l'hépatite C chez la femme enceinte et l'enfant**

En avril dernier la FDA a approuvé l'utilisation de sofosbuvir seul pour les enfants agés de 12 ans et plus infectés par les génotypes 2 et 3, ou une combinaison de sofosbuvir et de ledipasvir chez les enfants agés de 12 ans et plus infectés par les génotypes 1, 4, 5 et 6 (219). Les résultats d'une étude récemment présentée au « EASL International Liver Congress » a évalué l'effet de la combinaison de sofosbuvir et de ledipasvir chez 90 enfants agés de 6 à 11 ans infectés principalement par le VHC de génotype 1. Quatre vingt dix neuf pourcents (99%) des sujets présentaient des niveaux d'ARN du VHC indétectables 12 semaines après le traitement (220). Au Canada, aucune combinaison de DAA n'est encore approuvée pour traiter les enfants. À ce jour, l'inocuité d'aucune combinaison de DAA n'a été testée chez la femme enceinte.

## Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre l'influence de la réponse neutralisante sur la composition et l'évolution des populations virales présentes chez la femme enceinte et l'enfant infecté verticalement, et d'évaluer s'il existe un lien avec les différentes manifestations cliniques observées chez ces patientes (charge virale VHC; inflammation hépatique; survenue de la TV).

**1) Étude de la quasiespèce du VHC pendant la grossesse.** Dans ce premier volet de mes travaux de recherche, l'objectif était de caractériser avec précision la composition de la quasiespèce du VHC et la réponse neutralisante spécifique au VHC chez la femme enceinte afin de déterminer s'il existait une association entre elles ainsi qu'avec le portrait clinique retrouvé chez ces patientes.

**2) Caractérisation du goulot d'étranglement dans la transmission verticale du VHC.** Dans cette deuxième partie de mon travail, le but était de déterminer l'identité et la quantité de variantes transmises de la mère à l'enfant, estimer le moment de la TV et évaluer l'influence des réponses neutralisantes spécifiques au VHC de la mère et de l'enfant sur ce processus.

**3) Étude d'un cas particulier de transmission verticale du VHC.** Dans ce dernier volet, l'objectif était d'analyser la composition de la quasiespèce du VHC chez une enfant ayant été infectée verticalement par le VHC mais n'ayant jamais développé de réponse immunitaire adaptative spécifique au VHC.

### **3.1 Étude de la quasiespèce du VHC pendant la grossesse**

Plusieurs évidences suggèrent que l'environnement immunitaire particulier qu'est la grossesse influence le cours de l'infection par le VHC. À ce jour, aucune étude à grande échelle de la composition de la quasiespèce du VHC chez la femme enceinte n'a été effectuée. Pourtant, l'étude de la dynamique des populations virales basée sur les variantes d'HVR1 a souvent révélé des informations importantes, notamment sur l'issue de l'infection aiguë, l'intensité des dommages hépatiques et la réponse au traitement. De plus, deux études précédemment publiées par notre groupe suggèrent l'implication de la réponse humorale maternelle dans l'évolution de la quasiespèce du VHC. Nous avons donc entrepris la caractérisation détaillée de la quasiespèce du VHC par séquençage à haut débit et l'évaluation de la réponse neutralisante maternelle pendant la grossesse dans un groupe de 42 femmes enceintes infectées par le VHC (n=19) ou coinfectées par le VHC et le VIH-1 (n=23).

#### **Article 1: Quasispecies diversity and neutralizing antibody responses in vertical HCV transmission (soumis à Journal of Clinical Investigation)**

##### **Contribution des auteurs :**

AL : A effectué la mise au point et la préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit, l'analyse des données de séquençage et la majorité des tests de neutralisation. AL a aussi participé à la rédaction de l'article.

KAMM : A effectué une grande partie des essais de neutralisation hétérologue.

VC : A développé des outils bioinformatiques pour l'analyse des données de séquençage.

SFD : A participé à des discussions constructives ayant orienté notre décision quant à la manière d'analyser les données de séquençage.

JB : A développé des outils bioinformatiques pour l'analyse des données de séquençage.

DGR : A aidé à la mise au point du système de pseudoparticules autologues.

MB : Gynécologue obstétricien et médecin traitant des patientes de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS).

VL : Pédiatre infectiologue et médecin traitant des patientes de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS).

NL : Pédiatre immunologue et médecin traitant des patientes de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS).

IB : Gynécologues-obstétricienne et médecin traitant des patientes de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS).

DMM : Directrice exécutive du Women's health research institute (WHRI) de Vancouver. Nous a gracieusement donné plusieurs échantillons de patientes de sa cohorte.

MK : Médecin au British Columbia Center for disease Control, Vancouver. Nous a aussi gracieusement donné plusieurs échantillons de patientes de sa cohorte.

ALC : A effectué la mise au point du système de pseudoparticules ainsi qu'une partie des essais de neutralisation autologue.

HS : Conception et supervision du projet. Rédaction de l'article.



## **Quasispecies diversity and neutralizing antibody responses in vertical HCV transmission.**

**Authors :** Ariane Larouche<sup>1,2</sup>, Kimberly-Ann Milton McSween<sup>1,2</sup>, Virginie Calderon<sup>1,3</sup>, Sébastien Fauteux-Daniel<sup>1,2</sup>, Jonathan Boulais<sup>4</sup>, Doris G. Ransy<sup>1,2</sup>, Marc Boucher<sup>5,6</sup>, Valérie Lamarre<sup>5,7</sup>, Normand Lapointe<sup>5,7</sup>, Isabelle Boucoiran<sup>5,6</sup>, Deborah M. Money<sup>8</sup>, Mel Krajden<sup>9</sup>, Armelle Le Champion<sup>1,2</sup>, Hugo Soudeyns<sup>1,2,7</sup>

**Affiliations :** <sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; <sup>3</sup>Department of Informatics and Operations Research, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; <sup>4</sup>Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; <sup>5</sup>Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS), Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; <sup>6</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; <sup>7</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; <sup>8</sup>Women's Health Research Institute, Vancouver, British Columbia, Canada; <sup>9</sup>BC Center for Disease Control, Vancouver, British Columbia, Canada.

Address correspondence to Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Room 7961, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. Phone : 514.345.4931 #3907; Fax: 514.345.4794; Email: hugo.soudeyns@recherche-ste-justine.qc.ca (H. Soudeyns).

### **ABSTRACT (200 words)**

Vertical transmission is the major cause of pediatric HCV infection worldwide. To better understand the pathogenesis of hepatitis C during and after pregnancy and to provide insights into the risk factors and mechanisms involved in vertical HCV transmission, the evolutionary dynamics of HCV variant spectra and HCV-specific neutralizing antibody responses were examined using high throughput sequencing and pseudoparticle-based assays in pregnant

women monoinfected with HCV (n = 17) or coinfecting with HCV and HIV-1 (n = 15). Overall, statistically significant associations were found between HCV quasispecies diversity, selective pressure exerted on the HCV E2 envelope protein, and neutralizing activity of maternal immunoglobulins. Women with low quasispecies diversity displayed significantly higher mean AST and ALT levels throughout pregnancy, but this difference was restricted to monoinfected participants. Low quasispecies diversity and inefficient neutralizing activity were also significantly associated with vertical transmission, but only in the monoinfected group. These results indicate that maternal neutralizing antibody responses play an important role in the prevention of vertical HCV transmission, but not in presence of coinfection with HIV-1, and suggest that the mode/route of vertical HCV transmission differ between monoinfected and coinfecting women. These findings could inform clinical management strategies for prevention of vertical HCV transmission.

## **INTRODUCTION**

Hepatitis C virus (HCV) infection is prevalent and underdiagnosed in women of reproductive age (1). HCV can be transmitted from an infected woman to her child during pregnancy and at the time of delivery. While such vertical transmission appears to be comparatively inefficient (~10%), there continues to be no reliable medical or pharmacologic interventions to prevent it at this time (2, 3). It is well established that the rate of vertical HCV transmission is augmented significantly when the mother is also coinfecting with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) (4-6). We and others have proposed that inhibition by HIV-1 of maternal HCV-specific immune responses, potentially leading to heightened HCV viral burden, could be responsible for this increased transmission risk (2, 3, 7), but there is very little direct experimental evidence available in support of that hypothesis. Along the same lines, the third

trimester spike in HCV viral load and the rebound in markers of liver inflammation and fibrosis often observed in HCV-infected women during the postpartum period have been speculated to result from pregnancy-associated modulations of maternal immunity, including adaptive cellular immune responses mediated by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (8-10). In contrast, little attention was paid to the potential involvement of maternal HCV-specific antibody responses in pregnancy. Yet HCV-specific immunoglobulins (Ig) can mediate neutralization of HCV virions, can participate in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) directed against HCV-infected target cells, can be transferred to the fetus and passively persist in newborns and infants, and are known to exert significant selective pressure on HCV viral envelope proteins leading to diversification of the HCV quasispecies (11-13). To better understand the influence of HCV-specific Ig responses on the pathogenesis of hepatitis C during and after pregnancy and to provide insights into the risk factors and mechanisms involved in vertical HCV transmission, the evolutionary dynamics of HCV variant spectra and HCV-specific neutralizing antibody responses were examined using next generation sequencing and HCV pseudoparticle (HCVpp)-based assays in 17 pregnant women infected with HCV alone (19 pregnancies) and 15 who were coinfecting with HCV and HIV-1 (23 pregnancies), including 7 cases of vertical HCV transmission.

## **RESULTS**

**Study subjects.** Venous blood samples were obtained in the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and/or 3<sup>rd</sup> trimester of gestation and during the post-partum period from 32 women infected with HCV, including 15 who were coinfecting with HCV and HIV-1 (142 time points total; median = 3 time points/pregnancy; range = 2-4 time points/pregnancy). Seven of 32 women were followed during multiple pregnancies (2 pregnancies, n = 4; 3 pregnancies, n = 3), for a total of 42

pregnancies examined. Nineteen pregnancies involved a woman infected with HCV alone, and 23 involved coinfection with HCV and HIV-1. Seven cases of vertical HCV transmission were confirmed (16.7 %). Clinical characteristics of the study group are summarized in Table 1. There were no statistically significant differences between the monoinfected and coinfecting groups in terms of age at delivery, ALT levels during pregnancy, and distribution of HCV genotypes (Table 1). Gestational age of infants born to coinfecting mothers was lower than that of children born to monoinfected mothers (median = 37.3 and 39.0 weeks, respectively;  $p = 0.003$ ; unpaired t-test). Coinfecting women presented with higher HCV viral load than monoinfected women throughout every trimester of pregnancy did, and exhibited slightly higher AST levels overall. Monoinfected women showed higher ALT levels in postpartum than their coinfecting counterparts did (median = 61.0 IU/L and 37 IU/L, respectively;  $p = 0.0261$ ; Mann Whitney U test). Finally, there was no association between HCV viral load during pregnancy and occurrence of vertical transmission. This was true whether the mean or zenith HCV viral load during pregnancy were used, and whether the entire study group or monoinfected participants only were considered ( $p > 0.3394$ ; Mann-Whitney U test) (data not shown).

**HCV quasispecies structure and genetic diversity.** To assess quasispecies structure and composition, ultra-deep pyrosequencing of the N-terminal portion of HCV E2 was performed. Following quality control, a total of 890,457 sequences were retained for analysis (mean per time point = 6058; range = 246-29219). Quasispecies profiles were drawn based on the amino acid sequence of hypervariable region 1 (HVR1) of E2 for every sample/time point available (2-4 samples/time points per subject). See Figure 1 for representative quasispecies profiles, and Supplemental Figure 1 and Supplemental Figure 2 for complete

profiles on all study subjects. Quasispecies diversity was estimated by computing Shannon entropy for each sample/time point. Mean and nadir Shannon entropy over the duration of pregnancy were also computed. While a wide range of quasispecies diversity was observed in both monoinfected (range = 0.006-0.711) and coinfecting subjects (range = 0.011-0.666), there was no statistically significant difference in mean and nadir Shannon entropy between the two groups ( $p = 0.7915$  and  $p = 0.7630$ , respectively; unpaired t-test).

Study participants were stratified according to the « high diversity » (HD) or « low diversity » (LD) of their infecting HCV quasispecies using as a threshold the mean Shannon entropy computed based on the entire study group (i.e. 0.37). No statistically significant associations were found between quasispecies diversity (HD or LD) and HCV viral load, gestational age at birth, coinfection status, CD4<sup>+</sup> T cell counts, or HCV genotypes. However, coinfecting HD women were older at delivery than coinfecting LD women ( $p = 0.0452$ , Mann Whitney U test), and monoinfected LD women had higher levels of ALT and AST than monoinfected HD women ( $p = 0.0405$  and  $p = 0.0305$ , respectively; Mann Whitney U test). Among all variables tested, the strongest associations found were between quasispecies diversity and occurrence of vertical HCV transmission. This was observed in monoinfected women ( $p = 0.0030$ , OR = 25.67; Chi-squared test) and in the study group as a whole ( $p = 0.0135$ , OR = 9.00; Chi-squared test), but not in coinfecting women ( $p = 0.4743$ , OR = 1.1; Chi-squared test) (Figure 2A). Similar results were obtained using nadir instead of mean Shannon entropy values (Figure 2B). Overall, women who vertically transmitted HCV to their child exhibited significantly lower mean Shannon entropy and nadir during pregnancy than women who did not ( $p = 0.0272$  and  $p = 0.0251$ , respectively, Mann-Whitney U test) (Figure 2C and 2D). Separate examination of the monoinfected and coinfecting groups revealed that these

associations were still statistically significant when the woman was infected with HCV alone ( $p = 0.0117$  and  $p = 0.0186$ , respectively, Mann-Whitney U test) but not in coinfecting women ( $p = 0.4350$  and  $p = 0.4782$ , respectively, Mann-Whitney U test) (Figure 2C and 2D). These results indicate that patients in whom a low degree of HCV quasispecies diversity is observed during pregnancy are more likely to transmit HCV vertically, but that this association is not valid in the presence of maternal coinfection with HCV and HIV-1.

**Autologous neutralizing antibody responses.** Analysis of selective pressure exerted on HVR1 revealed that Shannon entropy (all subjects, all time points) was positively correlated with the value of dN (nonsynonymous mutations per nonsynonymous site) - dS (synonymous mutations per synonymous site) ( $p < 0.0001$ , Spearman's correlation test; Supplemental Figure 3A). Since HVR1 is a known target for humoral immunity, we evaluated maternal HCV-specific neutralizing response using aHCVpp and IgG extracted from the serum of 13 women, 8 of whom were infected with HCV alone (including 4 vertical transmission cases) (Figure 3) and 5 of whom were coinfecting with HCV and HIV-1 (including 2 vertical transmission cases) (Figure 4). Nine of 13 women (69.0%) were LD subjects (6 of 8 monoinfected and 3 of 5 coinfecting).

Most monoinfected women who exhibited neutralizing activity (4 out of 5; 80%) were able to neutralize every aHCVpp tested at every time point. In contrast, participant 31 showed decreased neutralizing activity against variants V4 and V7 during the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy (Figure 3A). Moreover, variant V7, which was identified exclusively during the 3<sup>rd</sup> trimester, was not neutralized by the serum sample obtained at the same time point, but was later neutralized in post partum, at a time when it was no longer detected.

In the monoinfected group, 3 of 6 LD women (50%; 2 transmitters and 1 non-transmitter) exhibited negligible neutralizing activity against all autologous variants tested (Figure 3). Similarly, in the coinfecting group, 1 of 3 LD women (33.3%; non-transmitter) showed negligible neutralizing activity (Figure 4). Of note, all 4 women (100%) in whom no neutralizing activity was detected exhibited an HCV quasispecies profile consisting of a single, major, persisting variant at all time points (TVC79A, TVC189A, TVC189B, and TV075; Supplemental Figure 1 and Supplemental Figure 2). In contrast, participant 16, who also exhibited a very homogeneous quasispecies characterized by the presence of a unique majority variant throughout pregnancy, showed strong and broad neutralizing activity directed against all autologous variants tested.

In coinfecting subjects, 2 out of 4 women (50%) who exhibited neutralizing activity strongly neutralized all aHCVpp tested at all time points. In contrast, participant TV233B did not neutralize the 233BV9 variant in the 1<sup>st</sup> trimester, but did (>60%) in the third trimester. 233BV9 was a majority variant in the 1<sup>st</sup> trimester (76.4% frequency), but had all but disappeared in the 3<sup>rd</sup> trimester (0.04% frequency). The neutralization of variants 233BV3 and 233BV10 was borderline throughout the study period, while the frequencies of these variants progressively increased in the quasispecies (1.5%-11.4%, and 0.86%-21.9% in the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters, respectively). In participant TCV153, neutralization of variants 153V2 and V3 was also borderline throughout pregnancy and in postpartum, with the relative frequencies of the variants in question remaining almost constant throughout the study period (Figure 4).

To further explore the relationship between quasispecies diversity, selective pressure, and neutralizing activity, mean % neutralization of all autologous and control variants was plotted against Shannon entropy and  $dN - dS$  at every time point for all 13 women. This analysis showed that the mean neutralizing activity was positively correlated with quasispecies complexity and selective pressure ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively; Pearson's correlation test) (Supplemental Figure 3B and Supplemental Figure 3C). The same statistically significant positive correlations were evidenced when mean Shannon entropy, mean  $dN - dS$  and mean neutralization activity were computer over entire individual pregnancies instead of individual time points (Supplemental Figure 3D and Supplemental Figure 3E). These results highlight the interdependency between the temporal dynamics of neutralizing HCV-specific antibody responses and HCV quasispecies evolution.

In monoinfected women, 2 out of 4 (50%) vertical transmitters (16 and 31) showed moderate (participant 31) and strong (participant 16) neutralizing activity (Figure 3A). Three out of 4 (75%) non-transmitters (TVC187, TVC181 and TVC79B) likewise exhibited comparatively strong neutralizing activity (Figure 3B). Similarly, in coinfecting women, autologous neutralizing activity was observed in both vertical transmitters (i.e. TVC55 and TVC233B) and non-transmitters (i.e. TVC153 and TVC171). Of note, neutralizing activity and mean Shannon entropy were both lower in participant TV233B than in participant TVC55 (transmitters; Figure 4A). In non-transmitters, participant TV075 showed negligible neutralizing activity and low quasispecies diversity, participant TVC153 showed moderate neutralizing activity and low quasispecies diversity, while participant TVC171 had strong neutralizing activity and high quasispecies diversity (Figure 4B).



We showed that low quasispecies diversity (LD participants) was a risk factor for vertical HCV transmission. However, we found that a sizable proportion of LD participants (5 of 9; 55.6%) were capable of neutralizing aHCVpp, including 3 transmitters (16, 31, TV233B; Figure 3, Figure 4). This suggests that protection from vertical HCV transmission is more strongly associated with higher quasispecies diversity than with the presence of neutralizing antibody responses directed against autologous HCV variants.

**Heterologous neutralizing antibody responses.** To further examine the relationship between transmission, quasispecies diversity, and neutralizing antibody responses, neutralizing activity was measured as above using as targets HCVpp generated using genotype-matched reference sequences and constructs, including HCV genotypes 1a, 1b, 2 and 4 (Supplemental Figure 4). Women infected with HCV genotype 3a were not tested due to the poor in vitro infectivity of the 3a-HCVpp in our hands. Women infected with HCV genotype 2r were tested against 2b-HCVpp. As above, with the exception of participant 16, every participant who exhibited a very homogeneous quasispecies characterized by the presence of a unique majority variant throughout pregnancy (i.e. TVC189A, TVC189B, TVC79A, TV075, TV179A, TV179B, TV247A, and TVC59) showed very weak or undetectable neutralizing activity in every case (Figure S4). This was seen in both monoinfected and coinfecting women.

Consistent with autologous neutralization results, the mean heterologous neutralizing activity was positively correlated with mean Shannon entropy and mean dN - dS values when the whole study group was considered ( $p = 0.0004$  and  $p < 0.0001$ , respectively; Pearson's correlation test), as well as when monoinfected ( $p = 0.0045$  and  $p = 0.0034$ , respectively;

Pearson's correlation test) and coinfecting women ( $p = 0.0104$  and  $p = 0.0013$ , respectively; Pearson's correlation test) were considered separately (data not shown). When the study group was stratified according to quasispecies diversity (HD and LD profiles), neutralization % was higher in HD participants whether the whole study group, monoinfected, or coinfecting women were examined, although the difference did not reach statistical significance in monoinfected women ( $p = 0.0247$ ,  $p = 0.1984$ , and  $p = 0.0446$ , respectively; Mann-Whitney U test) (Figure 5A). When the neutralization threshold was set at 50%, larger numbers of women exhibiting above-threshold heterologous neutralizing antibody responses were observed in the HD group whether the whole study group, monoinfected, or coinfecting women were examined, although the difference did not attain statistical significance in coinfecting women ( $p = 0.0149$ ,  $p = 0.0147$ , and  $p = 0.1807$ , respectively; Chi-squared test) (Figure 5B).

Finally, potential associations between heterologous neutralizing activity and the incidence of vertical transmission were explored. Mean heterologous % neutralizing activity during pregnancy was higher in mono-infected non-transmitters as compared to transmitters, but this difference was not statistically significant ( $p = 0.1658$ , Mann-Whitney U test) (Figure 5C). In this group, only 2 out of 4 women who transmitted HCV vertically (50%) showed mean heterologous neutralization above 50%, while 11 out of 12 non-transmitters (92%) did ( $p=0.0322$ , Chi-squared test) (Figure 5D). Conversely, mean heterologous % neutralizing activity during pregnancy was lower in coinfecting non-transmitters as compared to transmitters (Figure 5C), only 10 out of 18 (56%) patients who did not transmit HCV to their child had efficient (>50%) neutralization, and both women who transmitted HCV to their child had efficient neutralization, although these differences were not statistically significant

( $p = 0.1118$ , Chi-squared test). Taken together, these results indicate that above-threshold heterologous neutralizing Ig responses are more prevalent in HD subjects and are protective against vertical HCV transmission, but only in monoinfected, not coinfecting women. This suggests that the mode/route of vertical HCV transmission might differ between monoinfected and coinfecting pregnant women.

## **DISCUSSION**

In the present study, we investigated HCV quasispecies complexity and neutralizing antibody responses to HCV in pregnant women infected with HCV alone or coinfecting with HCV and HIV-1. We found that quasispecies diversity (expressed as Shannon entropy) was strongly correlated with selective pressure directed against HVR1 (expressed as  $dN - dS$ ) and neutralizing activity in both monoinfected and coinfecting groups. These results suggest that the level of HCV quasispecies diversity in pregnancy results from immune pressure exerted on HVR1 by maternal neutralizing antibody responses regardless of her coinfection status. Consistent with our results, several studies have previously demonstrated that HVR1 evolution was influenced by the antibody response (14-19). HCV quasispecies dynamics were also consistently associated with the extent of hepatic injury (20-23), response to interferon-based therapy (24-26) and outcome of acute HCV infection (27). Here we also showed for the first time that the complexity of the HVR1 quasispecies during pregnancy was associated with the risk of vertical HCV transmission in women infected with HCV alone but not in coinfecting mothers, suggesting an important role of maternal neutralizing antibody response in limiting vertical HCV transmission in absence of coinfection with HIV-1. In addition, our findings also imply that in presence of maternal coinfection with HCV and HIV-1, an effective neutralizing activity, although coercing the virus to evolve, is not sufficient to

prevent vertical transmission. This is consistent with previous results from Dowd et al. (2008), who reported that the presence of maternal HCV-specific neutralizing antibodies did not prevent vertical HCV transmission in a group of 63 women who were coinfecting with HCV and HIV-1 (28). However, to the best of our knowledge, the present study represents the first time that this hypothesis was tested in pregnant monoinfected women.

The exact mechanisms used by HCV to cross the placental barrier and establish infection in the child are currently unclear, but the comparatively low rate of maternofetal transmission (<10%) strongly suggests an active involvement of immune responses, which, during pregnancy, must be construed as the sum of maternal, placental, and fetal immunity (29). Cellular constituents of the placenta (e.g. syncytiotrophoblasts and cytotrophoblasts) express several HCV entry factors, including CD81, Claudin-1, Occludin, LDL-R, and SR-BI, and were found to be permissive for HCV uptake in cell culture (2, 30, 31). Nie et al. (2012) also reported in vitro evidence of HCV replication in cultured human cytotrophoblasts and observed HCV-like particles in cell cytoplasm, which argues in favor of the existence of an endocytosis-mediated internalization pathway for HCV in placental cells (32). These findings suggest that infection of the placenta by HCV could be one of the pathways leading to vertical HCV transmission. The ability of HCV virions to bind entry factors at the surface of the trophoblasts and trigger viral internalization would thereby represent an important determinant of vertical transmission. HVR1 was shown modulate HCV infectivity via its interaction with SR-BI (33-35) and HVR1-deleted virions or viral particles bound to anti-HVR1 antibodies showed reduced infectivity in vivo and in vitro (36, 37). Despite its considerable genetic variability, HVR1 contains highly conserved residues, conformations and physical properties (38, 39). Thus, immune pressure leading to amino acid changes in

conserved regions of HVR1 might have a deleterious effect on viral infectivity through impacting interactions with SR-BI (40, 41). This diminished infectivity of immune-selected HVR1 variants could have implications in limiting vertical transmission via direct infection of trophoblasts but also via the potential infection of or attachment to the cell surface of maternal PBMCs, that are known to transit across the placenta and whose carriage of HCV has been associated with an increased risk of vertical transmission (42-44). Overall, the association between HVR1 diversity and vertical transmission in monoinfected women suggests that the mechanisms involved in this context are receptor-specific and influenced by maternal immunity.

In contrast, no association between vertical HCV transmission, neutralizing activity, or HVR1 diversity was found in coinfecting women, suggesting a mostly non-specific mechanism of vertical transmission such as direct transfer of HCV variants via placental micro-hemorrhages. These results are consistent with our recent findings that the transmission bottleneck in HCV vertical transmission was very tight when the mother was infected with HCV alone, leading to a restricted number of transmitted variants, but relaxed in presence of maternal coinfection, where hundreds of viral variants were transferred to the child (45). In any case, our results clearly argue in favor of the mechanisms involved in vertical HCV transmission being fundamentally different according to the coinfection status of the mother. In light of our results, one must speculate that in pregnant, mono-infected women, the ability of the patient to generate sufficiently effective neutralizing antibody responses against HCV HVR1 might lead to reduced viral infectivity and/or ability to bind to PBMCs and thereby lead to protection from vertical HCV transmission.

This study has several limitations. First, although 32 women with HCV infection were enrolled in the study for a total of 42 pregnancies, the number of cases of vertical transmission of HCV that were observed in some strata were low (7 cases overall; 2 in coinfecting women). However, we respectfully consider that given the relative rarity of cases of mother-to-child HCV transmission and the comparatively high experimental definition of the cases that were examined, the present study ranks with the best in the field in terms of numeration. Second, the aHCVpp system, which involves switching an autologous HVR1 sequence over a uniform E2 background, may have led to expression of aberrant forms of E1E2 at the surface of HCVpps, which may have distorted the neutralization profile. However, aHCVpp where pseudoparticle production and infectivity were very low in absence of maternal antibodies, potentially indicative of conformational aberrations, were excluded from the analysis. Lastly, another limitation of the aHCVpp system is that HVR1-dependent enhancement of HCVpp infectivity could be due to the ability of HVR1 to influence the lipoprotein content of the virions and resulting SRB1 binding efficiency (34). The HCV assembly process is complex and involves many HCV structural and non-structural proteins at the endoplasmic reticulum (ER) membranes as well in the secretory pathway, resulting in viral particles being associated with an elaborate lipoprotein complex modulated by HVR1 and influencing infectivity (46). In the HCVpp system, assembly takes place at the plasma membrane, resulting in viral particles not being associated to the same extent with lipoproteins (47). Thus, our assessment of the relative HVR1-dependent infectivity levels of the variants found in transmitters versus non-transmitters was limited due to those physicochemical constraints. The results of this study could inform future management strategies of HCV-infected women willing to become pregnant and potentially encourage treatment with direct-acting antiviral agents in women

presenting with a low HCV quasispecies diversity in the preconception or early pregnancy period.

## **METHODS**

***Study subjects and clinical parameters.*** Study participants were enrolled at the Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS; CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada) and at the Women's Health Research Institute (WHRI; Vancouver, Canada) between 1990 and 2013. Thirty-two women were enrolled in the study. Seventeen women (19 pregnancies) were infected with HCV only, while 15 (23 pregnancies) were coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), for a total of 42 pregnancies. First, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy were defined as 1-13, 14-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. Gestational age was estimated based on fetal biometry or best available data (48). HCV infection in the child was confirmed by PCR at 2-4 months of age. HCV viral load was measured using the Cobas Amplicor HCV Monitor Test version 2.0 (Roche Diagnostics). HIV viral load was quantified using the Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (Bayer Corp.), with a lower limit of detection of 1.70 log<sub>10</sub> HIV-1 RNA copies/ml plasma. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were measured on a Synchron LX20 system (Beckman Coulter). Serum was separated from venous blood samples by centrifugation, aliquoted and stored at -80°C. HCV genotype and subtype were determined by sequence analysis of the NS5b region using primers DM100 and DM101 (49). Maximum-likelihood phylogenetic analysis was performed using MEGA version 5.2.2 (50).

***Viral RNA extraction, amplification, and sequencing.*** Viral RNA was extracted from 140 µl serum using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and eluted in 60 µl nuclease-free

water. cDNA synthesis was performed (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche) using 8 µl purified RNA and random hexamer primers for 1h at 60°C. The N-terminal region of E2 was amplified by nested-PCR (Phusion High Fidelity PCR Kit; New England BioLabs). Genotype-specific primers were designed according to conserved regions flanking E2 positions 1491-1787. Second round PCR primers, were designed and synthesized as required for use in the 454 sequencing procedure (i.e. 5'-Lib-Lprimer-Multiplex Identifier(MID)-gene-specific-sequence-5') (Integrated DNA technologies). Conditions for 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> round PCR consisted of 30 sec initial denaturation at 98°C, followed by 35 cycles of 15 sec denaturation (98°C), 30 sec annealing (Table S1), and 20 sec extension (72°C), followed by a final 10 min extension step (72°C). PCR products were purified using magnetic beads (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter), quantified (Quant-IT PicoGreen dsDNA Assay; ThermoFisher Scientific), and multiplexed in an equimolar pool as previously described (45). Unidirectional pyrosequencing was performed on a GS FLX+ sequencer (454 sequencing; Roche) with Titanium series reagents (McGill University/Genome Quebec Genome Center, Montreal, Canada).

***Analysis of sequencing data.*** Raw reads were split according to barcodes and sequences shorter than the length required to cover E2 positions 1491-1787 (HVR1 to HVR2) (360 bp for HCV genotype 1a) were filtered using a local implementation of Galaxy (51). Sequences were then aligned based on forward primer sequence using a custom Python script (Seq\_Pattern.py). Nucleic acid variant frequencies were computed using Galaxy. A profile-HMM for each genotype was computed based on the amino acid sequences, using hmmbuild (52). Each variant (nucleic acid sequence) was then compared to the profile-HMM to detect homopolymer errors or PCR artifacts identified as frameshifts using HMM-Frame (53).



Frameshifted sequences, identified from the output alignment, were discarded using custom Perl script. Error-free sequences were then truncated to isolate HVR1 and variant frequencies (amino acids and nucleic acids) were computed using Galaxy. The relative frequencies of variant  $H = \frac{\sum_{i=1}^n P_i \log P_i}{\log N}$  shared between time points were determined using a Python script (Frequency.py) and quasispecies profiles were generated using Apache OpenOffice 4.1.1. Quasispecies diversity was assessed by computing Shannon entropy using the formula:

Where  $H$  is the Shannon entropy,  $P$  is the relative frequency of variant  $i$  in the sample, and  $N$  is the total number of variants analyzed in the sample. To analyze the selective pressure exerted on HVR1 nucleic acid sequences, the frequency of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (dN), the frequency of synonymous substitutions per synonymous site (dS), and the dN-dS parameter were computed using MEGA5.2.2. To analyze the selective pressure exerted on HVR1 nucleic acid variants, a codon-based Z-test of neutral selection was performed with MEGA5.2.2 using the Nei-Gojobori method with Jukes-Cantor correction and 1000 bootstrap replicates.

***Production of autologous HCV pseudoparticles (aHCVpp) and neutralization assays.***

Vectors expressing E1 and E2 proteins from HCV genotype 1a (phCMV1a-RSE1E2), 1b (phCMV1b-RSE1E2), and 4 (phCMV4-RSE1E2) were produced as previously described (45). For the construct expressing genotype 2b envelope proteins (pCR3.1.2b-RSE1E2), site-directed mutagenesis was used to silence the RsrII site at position 4284 in the native UKN2b1.1 vector (54) to leave unique BamHI (position 704) and RsrII (position 1510) sites. DNA fragments were excised with corresponding restriction enzymes and replaced with

synthetic gene segments containing patient-derived HVR1 sequences and native E1E2 flanking sequences (GeneArt Strings, ThermoFisher Scientific). Vector integrity was verified by automated Sanger sequencing. aHCVpp were produced as described elsewhere (47). Briefly, HEK293T cells (American Type Culture Collection) were co-transfected with constructs expressing HCV E1E2 proteins, MLV Gag-pol packaging and MLV-based phCMV-luc constructs using calcium phosphate precipitation (ThermoFisher Scientific). Supernatants containing aHCVpp were collected 48h after transfection, aliquoted, and stored at -80°C for a period not exceeding 1 mo before use in neutralization assays. The E1E2 insert was removed from phCMV-7a (phCMV1a-ΔE1E2) to produce « naked » HCVpp that were used as negative controls. For neutralization assays, immunoglobulins (Ig) were first extracted from serum samples obtained from study subjects (Ig test) or healthy controls (Ig control) (NAb Spin Kit; ThermoFisher Scientific). Purified Ig were quantified and incubated (0.5 mg/ml) with aHCVpp for 1h at 37°C. The broadly neutralizing human monoclonal antibody AR3B (55) was used as a positive neutralization control. aHCVpp-Ig mixtures were then used to infect Huh7.5 human hepatocellular carcinoma cells (obtained from Tatsuo Takahashi, Health Science Research Resources Bank, Japan) for 5h (genotype 1a, 1b, and 2b) or 8h (genotype 4) at 37°C. After incubation, aHCVpp-Ig were replaced with fresh medium and cells were incubated at 37°C for an additional 72h. Luciferase activity was measured using a Mithras LB 940 luminometer (Berthold Technologies) and results were expressed as % neutralization, as described previously (45). For measurement of heterologous neutralizing activity, HCVpp generated using genotype-matched reference sequences and constructs, including HCV genotypes 1a, 1b, 2 and 4, were used as targets.

**Study approval.** This study was approved by the Institutional Review Board for Ethics of CHU Sainte-Justine. Written informed consent was obtained from participants prior to inclusion in the study.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

A.L., K.A.M.M., V.C., S.F.D., D.G.R., M.B., V.L., N.L., I.B., D.M.M., M.K., and A.L.C. performed research; J.B. contributed new analytic tools; A.L., V.C., A.L.C., and H.S. analyzed data; H.S. designed research; A.L., V.C., I.B., A.L.C., and H.S. wrote the paper.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Silvie Valois for expert technical support, François-Loïc Cosset, INSERM U1111, ENS Lyon, France, for providing the phCMV-E1E2 vector, and Mansun Law, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, for kindly providing the AR3B monoclonal antibody. Supported by grants no. HOP-98831 and HOP-131561 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and by an infrastructure grant from 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. K.A.M.M. was the recipient of a graduate scholarship from FRQS. A.L. and A.L.C. were recipients of graduate (A.L.) and post-graduate (A.L.C.) scholarships from CIHR. I.B. is a Junior 1 Clinical Research Fellow of FRQS.

## **REFERENCES**

1. Ly KN, et al. Hepatitis C virus infection among reproductive-aged women and children in the United States, 2006 to 2014. *Ann Intern Med.* 2017;166(11):775-782.

2. Le Campion A, Larouche A, Fauteux-Daniel S, Soudeyns H. Pathogenesis of hepatitis C during pregnancy and childhood. *Viruses*. 2012;4(12):3531-3550.
3. Prasad MR, Honegger JR. Hepatitis C virus in pregnancy. *Am J Perinatol*. 2013;30:149-160.
4. Hershow RC, et al. Increased vertical transmission of human immunodeficiency virus from hepatitis C virus-coinfected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis*. 1997;176(2):414-420.
5. Papaevangelou V, et al. 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*. 1998;178(4):1047-1052.
6. Polis CB, Shah SN, Johnson KE, Gupta A. Impact of maternal HIV coinfection on the vertical transmission of hepatitis C virus: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2007;44(8):1123-1131.
7. Thomas SL, Newell ML, Peckham CS, Ades AE, Hall AJ. 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*. 1998;27(1):108-117.
8. Gervais A, et al. Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2000;32(2):293-299.
9. Fontaine H, Nalpas B, Carnot F, Brechot C, Pol S. Effect of pregnancy on chronic hepatitis C: a case-control study. *Lancet*. 2000;356(9238):1328-1329.
10. Oketani M, Shibatou T, Yamashita K, Arima T, Arima T. Postpartum acute exacerbation of chronic hepatitis C with complete response to interferon-alpha. *J Gastroenterol*. 2002;37(8):658-662.

11. Law M, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med.* 2008;14(1):25-27.
12. Nattermann J, et al. Serum antibodies against the hepatitis C virus E2 protein mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *J Hepatol.* 2005;42(4):499-504.
13. Troesch M, et al. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology.* 2006;352(2):357-367.
14. Booth JC, Kumar U, Webster D, Monjardino J, Thomas HC. Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology.* 1998;27(1):223-227.
15. Christie JM, Chapel H, Chapman RW, Rosenberg WM. Immune selection and genetic sequence variation in core and envelope regions of hepatitis C virus. *Hepatology.* 1999;30(4):1037-1044.
16. Gaud U, Langer B, Petropoulou T, Thomas HC, Karayiannis P. Changes in hypervariable region 1 of the envelope 2 glycoprotein of hepatitis C virus in children and adults with humoral immune defects. *J Med Virol.* 2003;69(3):350-356.
17. Dowd KA, Netski DM, Wang XH, Cox AL, Ray SC. Selection pressure from neutralizing antibodies drives sequence evolution during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology.* 2009;136(7):2377-2386.
18. Liu L, Fisher BE, Thomas DL, Cox AL, Ray SC. Spontaneous clearance of primary acute hepatitis C virus infection correlated with high initial viral RNA level and rapid HVR1 evolution. *Hepatology.* 2012;55(6):1684-1691.
19. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology.* 2007;132(2):667-678.

20. Farci P, et al. Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(22):8475-8480.
21. Sullivan DG, Wilson JJ, Carithers RL, Perkins JD, Gretch DR. Multigene Tracking of Hepatitis C Virus Quasispecies after Liver Transplantation: Correlation of Genetic Diversification in the Envelope Region with Asymptomatic or Mild Disease Patterns. *J Virol*. 1998;72(12):10036-10043.
22. Brambilla S, et al. Dynamics of hypervariable region 1 variation in hepatitis C virus infection and correlation with clinical and virological features of liver disease. *Hepatology*. 1998;27(6):1678-1686.
23. Curran R, et al. Evolutionary trends of the first hypervariable region of the hepatitis C virus E2 protein in individuals with differing liver disease severity. *J Gen Virol*. 2002;83:11-23.
24. Farci P, et al. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3081-3086.
25. Chambers TJ, et al. Quasispecies Heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2005;79(5):3071-3083.
26. Okada S-I, Akahane Y, Suzuki H, Okamoto H, Mishiro S. The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology*. 1992;16(3):619-624.
27. Farci P, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. 2000;288(5464):339-344.

28. Dowd KA, et al. Maternal neutralizing antibody and transmission of hepatitis C virus to infants. *J Infect Dis.* 2008;198(11):1651-1655.
29. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):425-433.
30. Giugliano S, et al. Hepatitis C virus sensing by human trophoblasts induces innate immune responses and recruitment of maternal NK cells: potential implications for limiting vertical transmission. *J Immunol.* 2015;195(8):3737-3747.
31. Shen L, et al. Up-regulation of CD81 inhibits cytotrophoblast invasion and mediates maternal endothelial cell dysfunction in preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(8):1940-1945.
31. Nie QH, et al. Hepatitis C virus infection of human cytotrophoblasts cultured in vitro. *J Med Virol.* 2012;84(10):1586-1592.
33. Bankwitz D, et al. Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol.* 2010;84(11):5751-5763.
34. Dao Thi VL, et al. Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem.* 2012;287(37):31242-31257.
35. Scarselli E, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 2002;21(19):5017-5025.
36. McCaffrey K, Gouklani H, Boo I, Pountourios P, Drummer HE. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 1):112-121.

37. Vieyres G, Dubuisson J, Patel AH. Characterization of antibody-mediated neutralization directed against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 3):494-506.
38. Callens N, et al. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol.* 2005;79(24):15331-15341.
39. Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais P-O, Deléage G, Pawlotsky J-M. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol.* 2001;75(12):5703-5710.
40. Bartosch B, et al. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol.* 2005;79(13):8217-8229.
41. Dreux M, Cosset FL. The scavenger receptor BI and its ligand, HDL: partners in crime against HCV neutralizing antibodies. *J Viral Hepat.* 2007;Suppl 1:68-76.
42. Azzari C, Resti M, Moriondo M, Ferrari R, Lionetti P, Vierucci A. Vertical transmission of HCV is related to maternal peripheral blood mononuclear cell infection. *Blood.* 2000;96(6):2045-2048.
43. Azzari C, et al. Higher risk of hepatitis C virus perinatal transmission from drug user mothers is mediated by peripheral blood mononuclear cell infection. *J Med Virol.* 2008;80(1):65-71.
44. Natarajan V, et al. HCV in peripheral blood mononuclear cells are predominantly carried on the surface of cells in HIV/HCV co-infected individuals. *J Med Virol.* 2010;82(12):2032-2037.

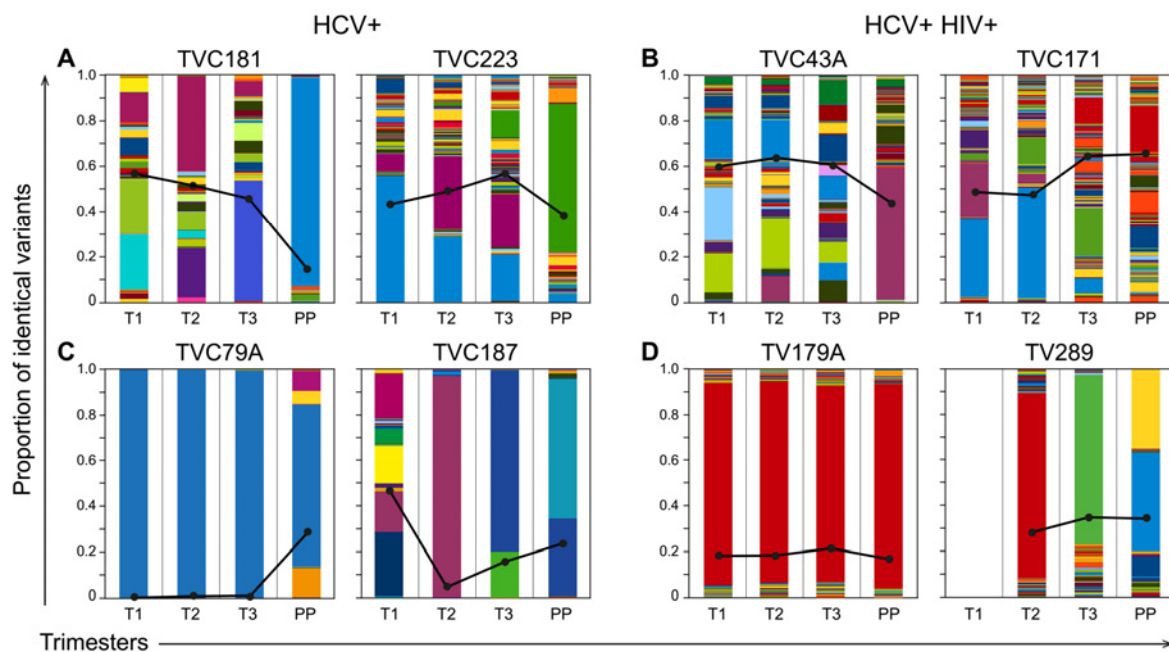


45. Fauteux-Daniel S, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus: variable transmission bottleneck and evidence of mid-gestation in utero infection. *J Virol*. 2017 [Epub ahead of print].
46. Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):688-700.
- b47. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1–E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*. 2003;197(5):633-642.
48. Butt K, Lim K, Diagnostic Imaging Committee. Determination of gestational age by ultrasound. *J Obstet Gynaecol Can*. 2014;36(2):171-181.
49. Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1102-1112.
50. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2731-2739.
51. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Galaxy T. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol*. 2010;11(8):R86.
52. <http://hmmer.org/>.
53. Zhang Y, Sun Y. HMM-FRAME: accurate protein domain classification for metagenomic sequences containing frameshift errors. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:198.

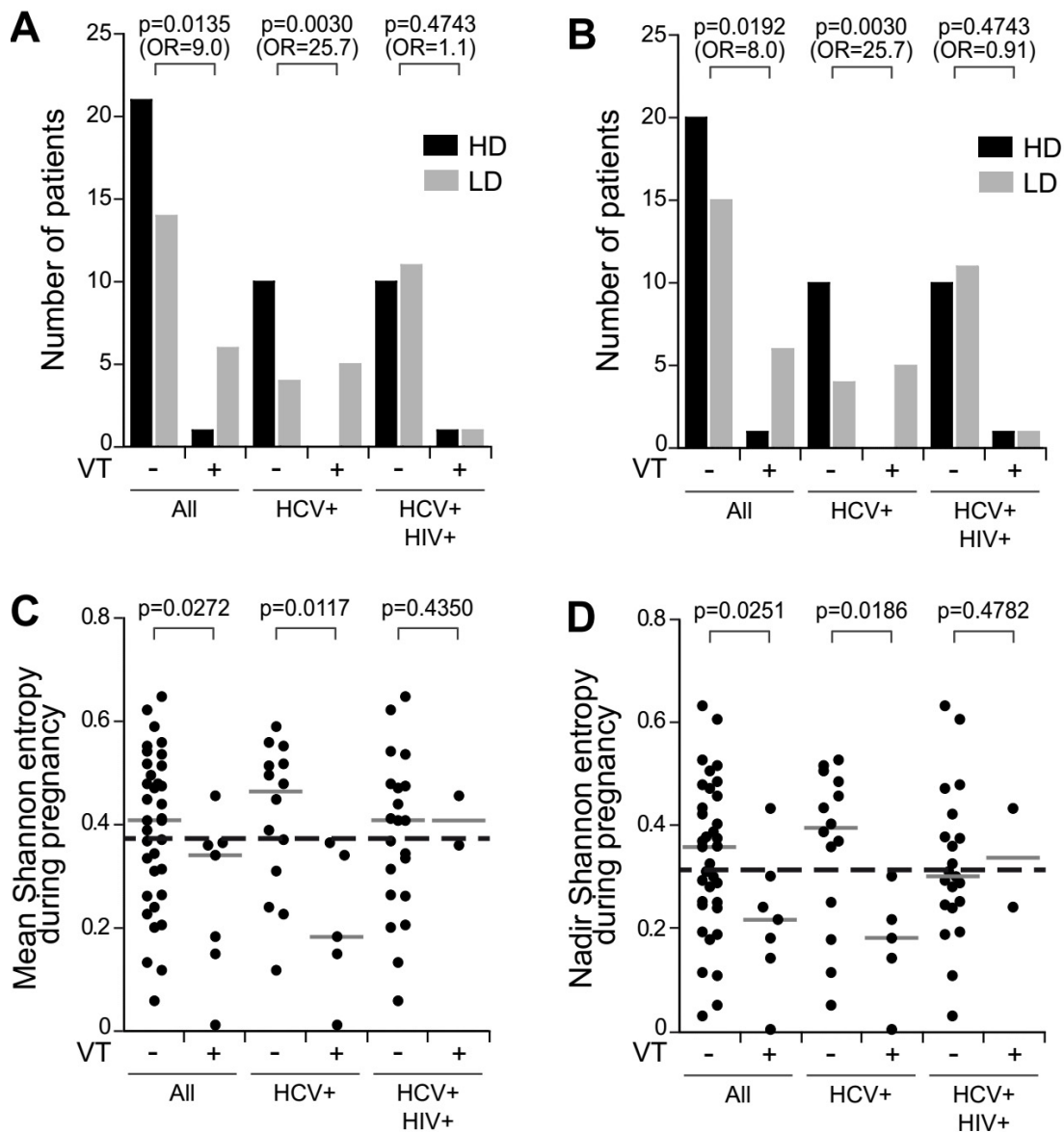
54. Lavillette D, et al. Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2005;79(10):6023-6034.

55. Law M, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med.* 2008;14(1):25-27.

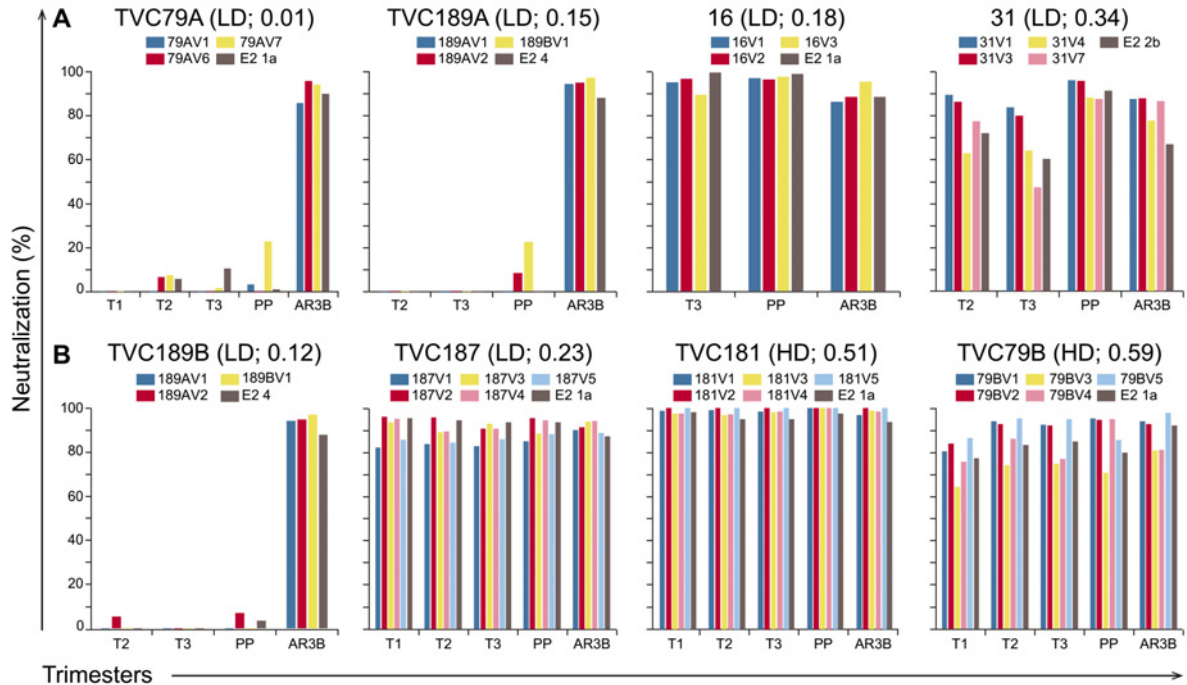
## FIGURES AND TABLES



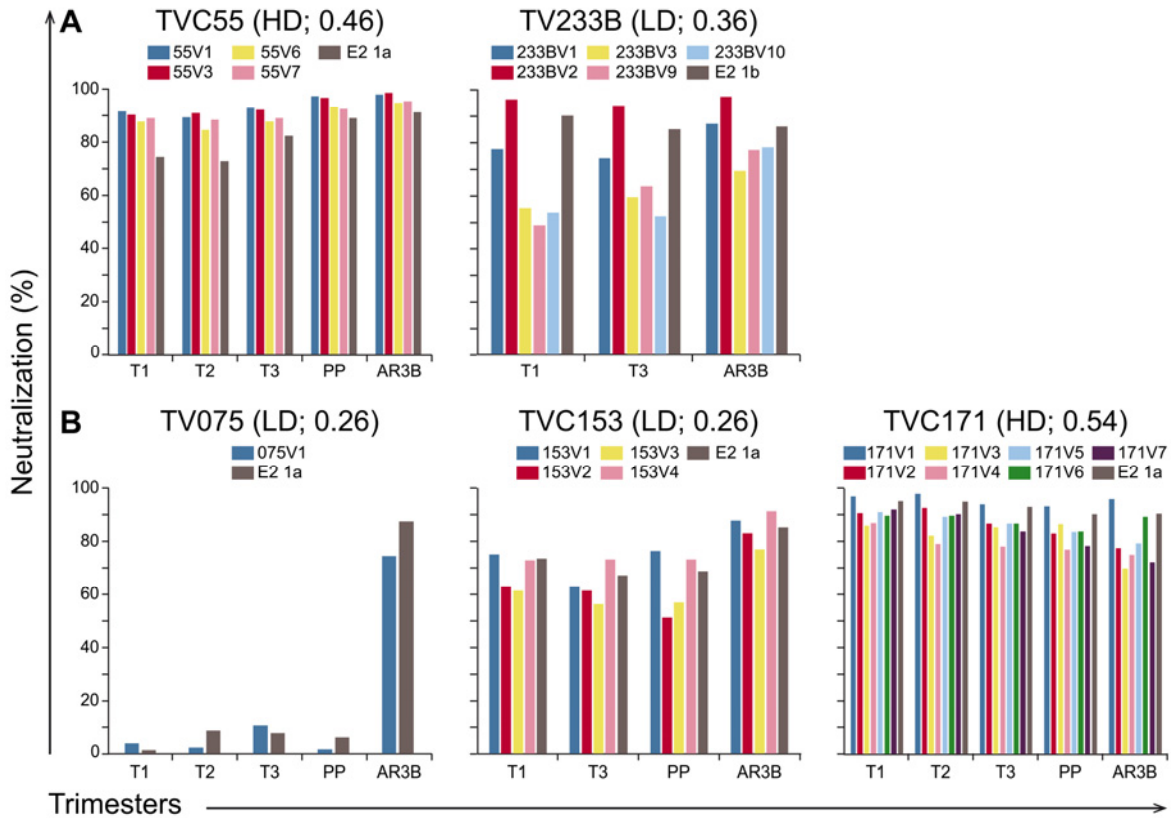
**Figure 1: Analysis of quasispecies structure based on HVR1 amino acid variants of eight study subjects.** Colored boxes represent identical variants in individual charts but not in between charts. Black curves: Shannon entropy. A Shannon entropy value of 0.37 was used as a threshold to stratify the participants as high (HD) or low (LD) diversity. A and C. Quasispecies profiles of participants infected with HCV alone. B and D. Quasispecies profiles of participants coinfecting with HCV and HIV-1. A and B. High diversity groups. C and D. Low diversity groups. T1, T2, T3: first, second and third trimesters of pregnancy. PP: post partum.



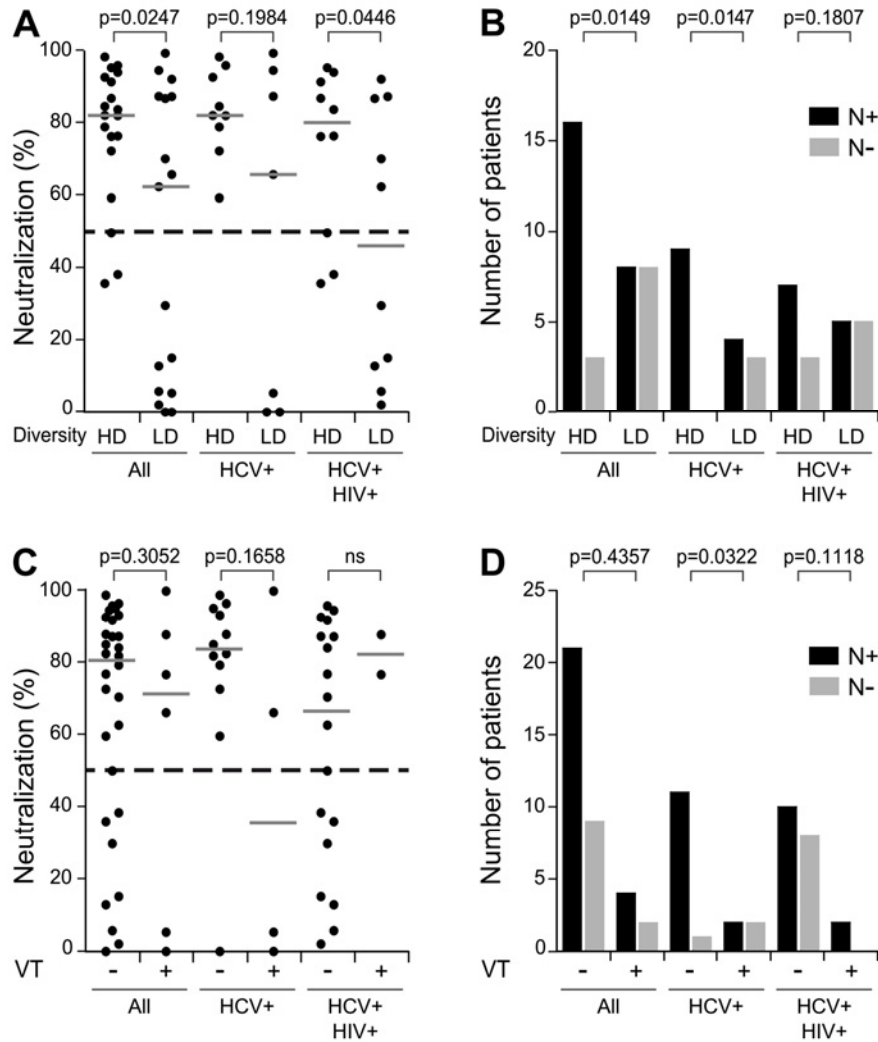
**Figure 2: Analysis of quasispecies diversity in function of vertical transmission in the whole cohort and in the monoinfected and coinfecting groups.** A. Number of high and low diversity participants (based on mean Shannon entropy during pregnancy) who vertically transmitted HCV or not. B. Number of high and low diversity participants (based on the nadir of Shannon entropy during pregnancy) who vertically transmitted HCV or not. C. Mean Shannon entropy during pregnancy as a function of vertical transmission. D. Nadir of Shannon entropy during pregnancy as a function of vertical transmission. Dashed lines represent the threshold used to stratify the participants as high or low diversity. Statistical significance of observed differences was tested using the chi-squared test (panels A and B) and the Mann-Whitney U test (panels C and D). VT: vertical transmission. HD: high diversity. LD: Low diversity.



**Figure 3: Neutralizing activity directed against autologous HCV pseudoparticles in sera of participants infected with HCV only.** Neutralizing activity was tested using aHCVpp bearing autologous HVR1 E2 fragment derived from participants quasispecies and IgG extracted from participants sera as described under material and methods. Infectious aHCVpp were tested along with HCVpp produced with the native HCV-1a, 2b and 4 E1E2 constructs. Mean Shannon entropy during pregnancy is indicated under the participant ID. A. Vertical transmission cases. B. Cases of non-transmission.



**Figure 4: Neutralizing activity directed against autologous HCV pseudoparticles in sera of participants coinfecting with HCV and HIV-1.** Neutralizing activity was tested using aHCVpp bearing autologous HVR1 E2 fragment derived from participants quasispecies and IgG extracted from participants sera as described under material and methods. Infectious aHCVpp were tested along with HCVpp produced with the native HCV-1a and 1b E1E2 constructs. Mean Shannon entropy during pregnancy is indicated under the participant ID. A. Vertical transmission cases. B. Cases of nontransmission.



**Figure 5: Neutralizing activity directed against heterologous HCV pseudoparticles according to diversity, HCV vertical transmission and coinfection status.** Heterologous neutralizing activity was tested using as targets HCVpp generated using genotype-matched reference sequences and constructs, including HCV genotypes 1a, 1b, 2 and 4, and IgG extracted from participants sera as described under material and methods. A. Mean neutralizing activity during pregnancy in the high and low diversity groups according to coinfection status. B. Distribution of participants displaying strong (N+) or weak (N-) mean neutralizing activity during pregnancy according to coinfection status. C. Mean neutralizing activity during pregnancy in vertical transmitters and non-transmitters according to coinfection status. D. Distribution of participants displaying strong and weak mean neutralizing activity during pregnancy according to coinfection status. Strong (N+) neutralization was defined by a mean neutralizing activity of  $\geq 50\%$  during pregnancy. Weak (N-) neutralization was defined by a mean neutralizing activity of  $< 50\%$  during pregnancy. Statistical significance of observed differences was tested using the Mann-Whitney U test (panels A and C) and the chi-squared test (panels B and D). VT: vertical transmission. HD: high diversity. LD: low diversity. Weak (N-) neutralization is defined by a mean neutralization of  $< 50\%$  during pregnancy. VT: vertical transmission. HD: high diversity. LD: low diversity.

**Table 1: Characteristics of the study groups (HCV mono-infected and HCV/HIV coinfectd)**

Characteristics		HCV+ (n=19)	HCV+/HIV+ (n=23)	p value
Maternal age at delivery (yrs)		31.3 (20.7-42.1)	31.4 (21.0-42.4)	0.9899
Gestational age (wks)		39.0 (35-41)	37.3 (32-41)	<b>0.003</b>
HCV viral load (log(IU/ml))	T1	5.371 (4.859 - 5.816)	6.396 (2.956 - 6.980)	<b>0.0321</b>
	T2	5.469 (4.847 - 6.487)	6.151 (4.757 - 7.090)	<b>0.0432</b>
	T3	5.628 (5.167 - 6.717)	6.312 (3.380 - 7.199)	<b>0.0181</b>
	PP	5.377 (3.065 - 7.027)	6.253 (4.087 - 7.347)	<b>0.0135</b>
	All time points combined	5.557 (3.065 - 7.027)	6.267 (2.956 - 7.347)	<b>&lt;0.0001</b>
AST (IU/L)	T1	44.5 (16 - 76)	35.0 (14 - 337)	0.8541
	T2	26.5 (10 - 86)	34.5 (11 - 185)	0.9379
	T3	26.0 (13 - 64)	28.5 (11 - 206)	0.9741
	PP	61.0 (22 - 265)	37.0 (10 - 178)	<b>0.0489</b>
	All time points combined	36.5 (10 - 265)	31.0 (10 - 337)	0.5439
ALT (IU/L)	T1	27.0 (16 - 43)	32.5 (20 - 385)	0.2086
	T2	22.0 (16 - 81)	31.0 (16 - 192)	0.1598
	T3	25.0 (17 - 60)	32.0 (16 - 194)	0.0739
	PP	42.0 (27 - 149)	49.0 (17 - 117)	0.6836
	All time points combined	27.0 (16 - 149)	35.0 (16 - 385)	<b>0.0261</b>
Number of HCV vertical transmission cases		5 (26.3)	2 (8.7)	0.1272
HCV genotypes	1a/1b	12 (63.2)	14 (60.9)	
	2b/2r	1 (5.3)	3 (13.0)	0.5593
	3a	3 (15.8)	3 (13.0)	(1 vs non-1)
	4a/4k	3 (15.8)	3 (13.0)	

Values are expressed as median (range) or number (%). T1, T2 and T3: first, second and third trimesters of pregnancy respectively. PP: post partum.

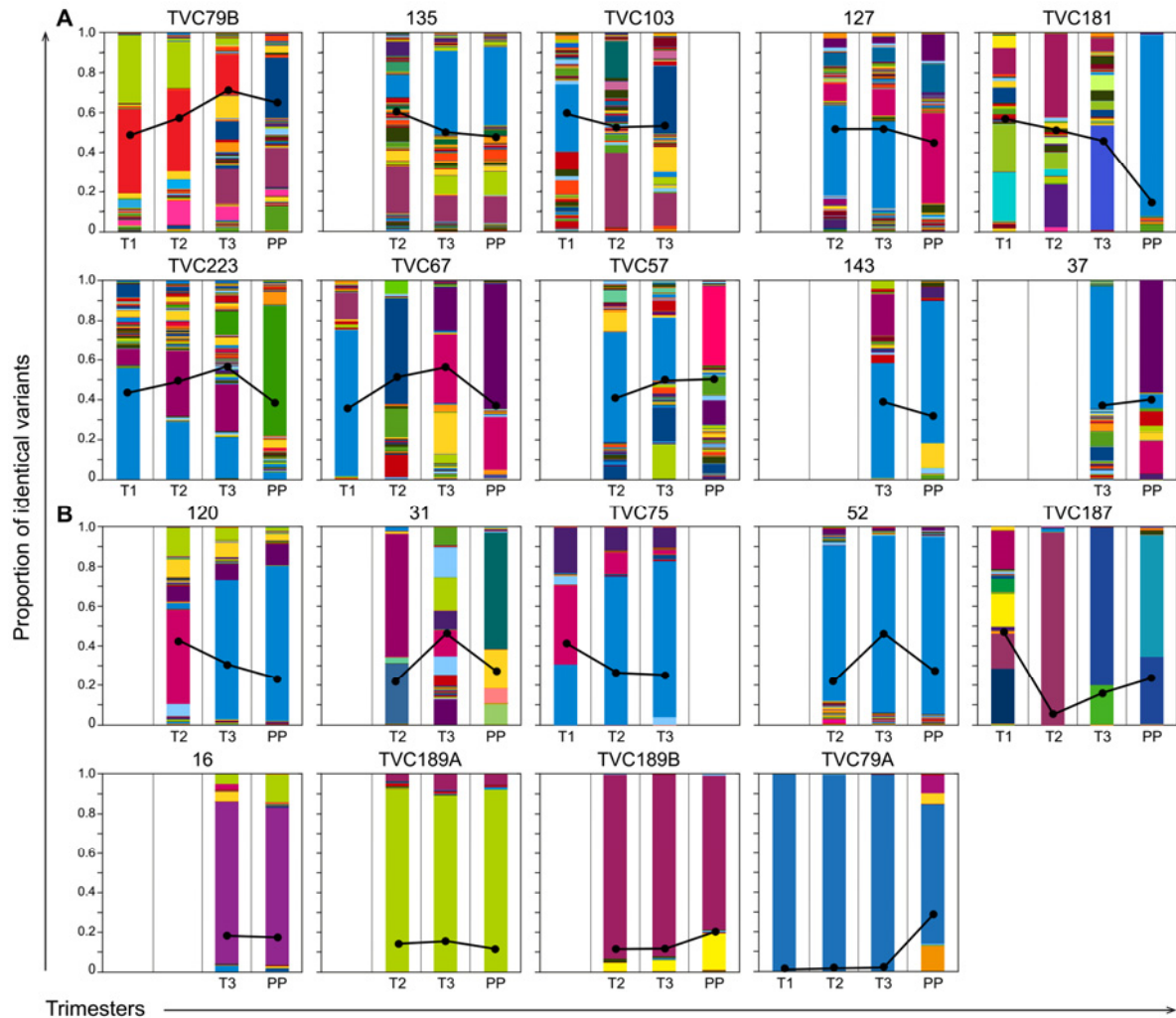
**Table 2: Characteristics of the high and low diversity groups.**

Characteristics		HD group (n=22)	LD group (n=20)	p value
Maternal age at delivery (yrs)	Cohort	31.8 (20.7-42.4)	29.1 (20.9-42.1)	0.4449
	HCV+	24.5 (20.7-41.2)	36.0 (20.9-42.1)	0.0912
	HCV+/HIV+	32.7 (23.3-42.4)	26.1 (21.0-39.1)	<b>0.0452</b>
Mean HCV viral load (log(IU/ml))	Cohort	5.799 (4.726-6.903)	6.028 (3.977-6.997)	0.3297
	HCV+	5.549 (4.970-6.602)	5.482 (5.290-6.402)	0.4841
	HCV+/HIV+	6.502 (4.726-6.903)	6.279 (3.977-6.997)	0.1861
Gestational age (wks)	Cohort	38.5 (33-41)	38.5 (32-41)	0.4128
	HCV+	39.5 (37-41)	39.0 (35-41)	0.1649
	HCV+/HIV+	36.5 (33-40)	37.0 (32-41)	0.3706
Coinfection status	Yes	12 (54.5)	11 (55.0)	1.0000
	No	10 (45.5)	9 (45.0)	
Mean AST (IU/L)	Cohort	27.7 (18.7-67.3)	31.5 (20.0-204.0)	<b>0.0294</b>
	HCV+	25.0 (18.7-33.0)	35.7 (20.0-65.0)	<b>0.0305</b>
	HCV+/HIV+	32.0 (19.0-67.3)	31.5 (20.5-24.0)	0.2118
Mean ALT (IU/L)	Cohort	27.3 (13.0-70.3)	32.5 (13.0-225.0)	0.0827
	HCV+	27.3 (13.0-59.0)	45.7 (22.0-74.0)	<b>0.0405</b>
	HCV+/HIV+	27.7 (15.0-70.3)	31.0 (13-225)	0.4027
CD4 counts (cells/mm <sup>3</sup> )		599.5 (469.0-983.8)	554.5 (186.0-725.0)	0.1467
HCV genotypes (1/non-1)	Cohort	13 (59.1)/9(40.9)	13(65.0)/7(35.0)	0.3468
	HCV+	8(80.0)/2(20.0)	4(44.4)/5(55.6)	0.1299
	HCV+/HIV+	5(41.7)/7(58.3)	9(81.8)/2(18.2)	0.0602
HCV vertical transmission	Cohort	1(4.5)/21(95.5)	6(30.0)/14(70.0)	<b>0.0135</b>
	HCV+	0(0.0)/10(100.0)	5(55.6)/4(44.4)	<b>0.0030</b>
	HCV+/HIV+	1(8.3)/11(91.7)	1(9.1)/10(90.9)	0.4743

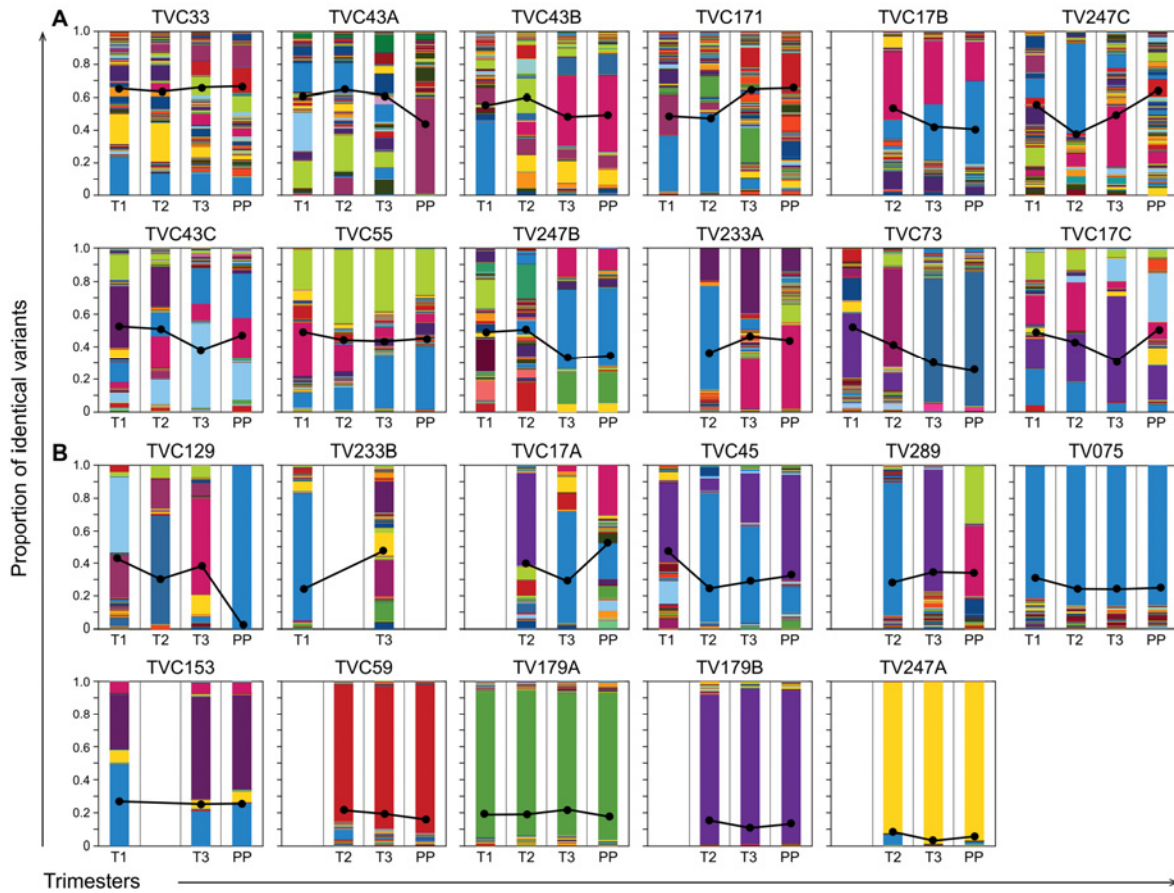
Values are expressed as median (range) or number (%). HD: high diversity. LD: Low diversity.



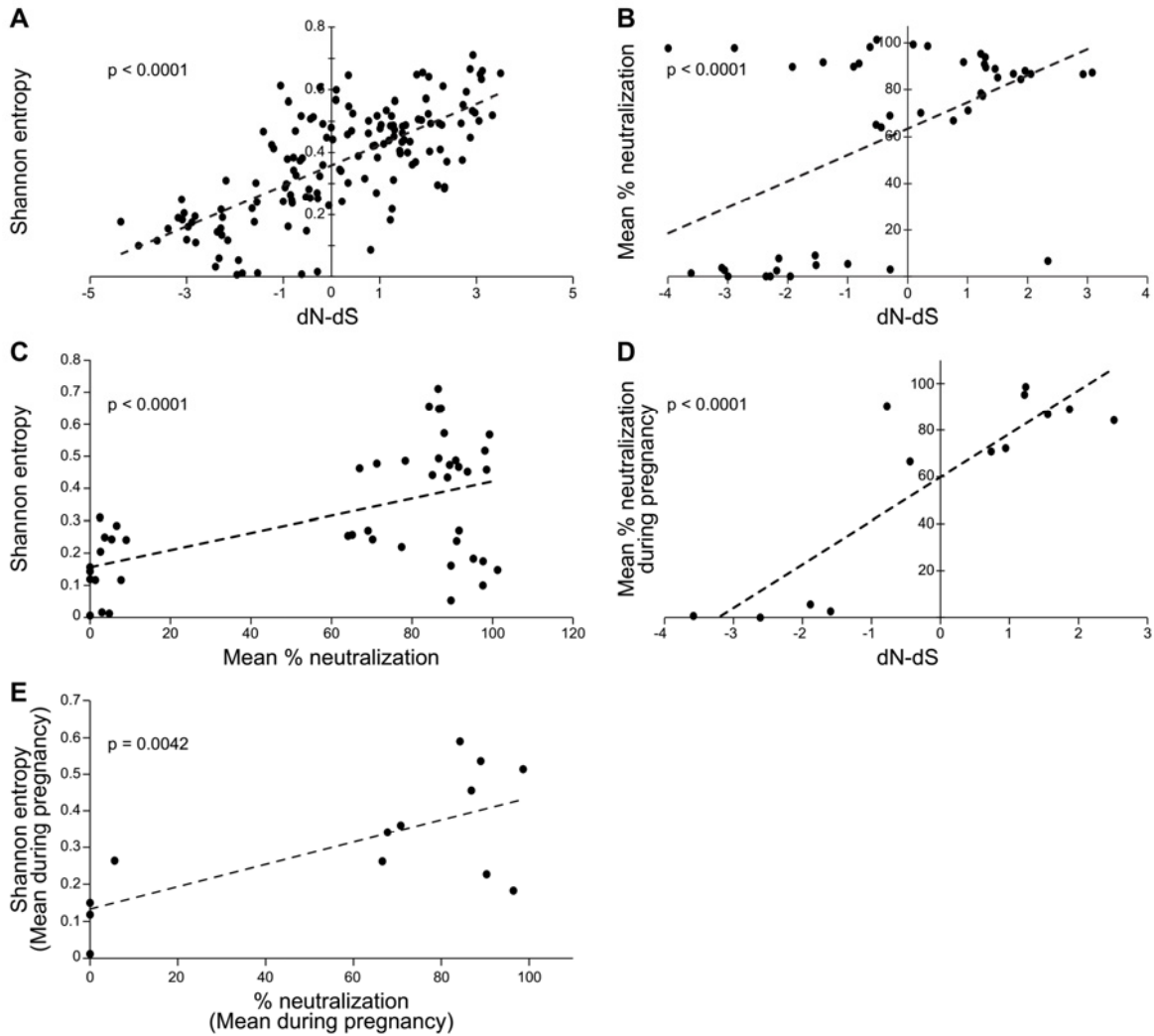
SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLES



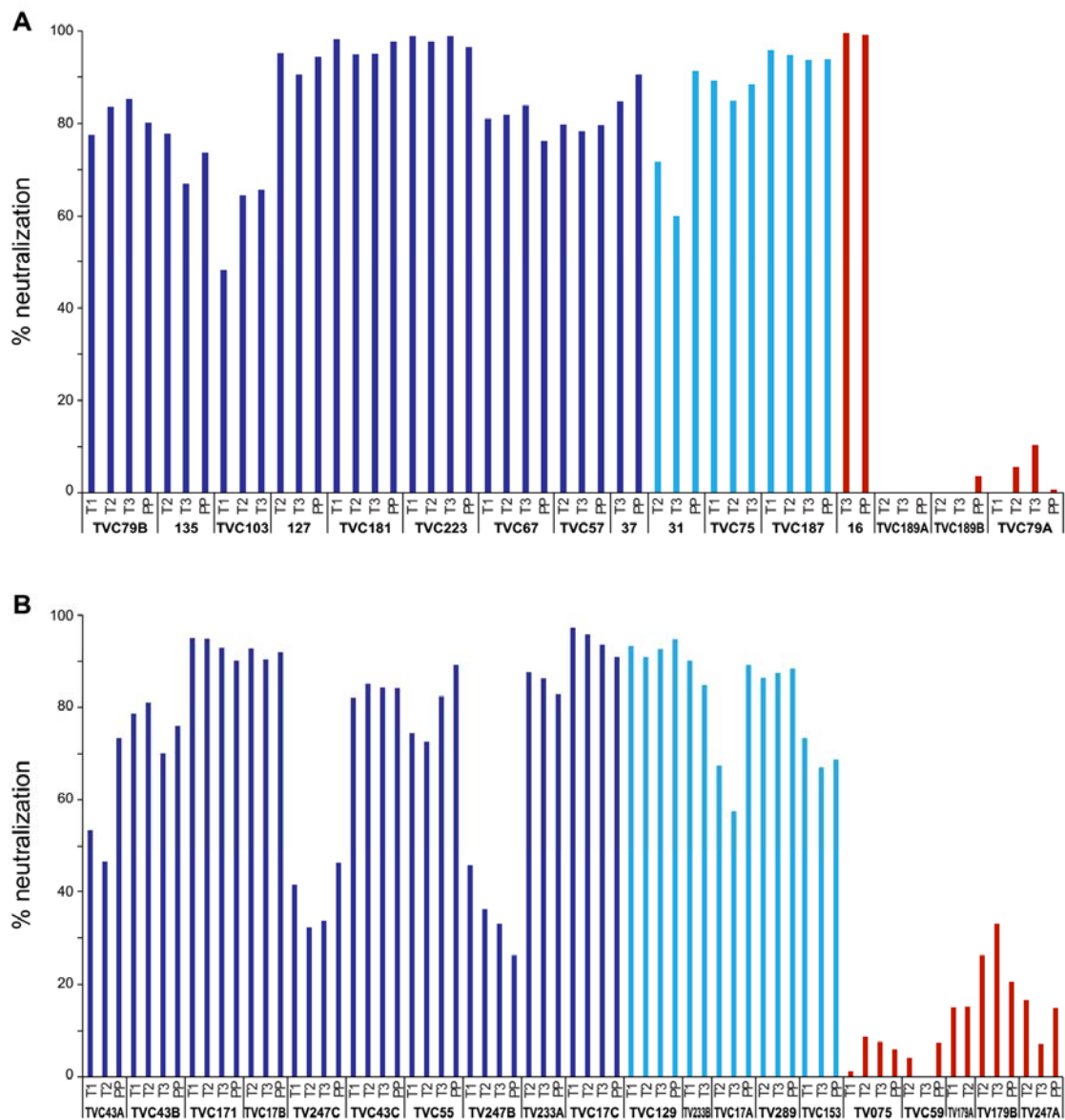
**Figure S1: Analysis of quasispecies structure based on HVR1 amino acid variants in participants infected with HCV only.** Colored boxes represent identical variants in individual charts but not in between charts. Black curves: Shannon entropy. A Shannon entropy value of 0.37 was used as a threshold to stratify the participants as high (A) or low (B) diversity. A, B, and C in participant identifiers refer to a first, second, or third consecutive pregnancy, respectively



**Figure S2: Analysis of quasispecies structure based on HVR1 amino acid variants in coinfecting patients.** Colored box represent identical variants in each chart but not in between charts. Black curves: Shannon entropy. A Shannon entropy value of 0.37 was used as a threshold to stratify the patients as high (A) or low (B) diversity.



**Figure S3: Association between Shannon entropy, dN-dS values and autologous neutralization.** A. Shannon entropy as a function of dN-dS value at each time point. B. Mean % autologous neutralization during pregnancy as a function of dN-dS values. C. Shannon entropy as a function of mean % neutralization of all variants tested at each time point. D. Mean % neutralization during pregnancy as a function of dN-dS values. E. Mean Shannon entropy as a function of mean % neutralization during pregnancy. Statistical significance of associations was tested using Pearson's correlation test.



**Figure S4: Heterologous neutralizing activity in sera of participants according to gestational age and coinfection status.** Heterologous neutralizing activity was tested using as targets HCVpp generated using genotype-matched reference sequences and constructs, including HCV genotypes 1a, 1b, 2 and 4, and IgG extracted from participants sera as described under material and methods. A. Participants infected with HCV alone. B. Participants coinfecting with HCV and HIV-1. T1, T2, T3: first, second and third trimesters of pregnancy. PP: post partum. A, B, and C in participant identifiers refer to a first, second, or third consecutive pregnancy, respectively.

**Table S1: Genotype specific primers**

Genotype and primer	Outer/Inner primer	Polarity	Sequence (5'-3')	Position*	Hybridization T° (C°)	Amplicon size (bp)	
1a:	Fext-1a	Outer	Sens	GGCATGGGATATGATGATG	1295-1313	55	1269
	Rext-1a	Outer	Antisens	ATGAGTARCATCATCCA	2547-2563		
	Fspec-1a	Inner	Sens	TCCATGGTGGGGAAGTGGGCGAA	1428-1450	68	578
	Rev-1a	Inner	Antisens	ATCCAGGTGCAACCGAACCAATTGCC	1980-2005		
1b:	Fext-1b2	Outer	Sens	ATGGCTTGGGAYATGAT	1293-1309	55	1123
	Rext-1b2	Outer	Antisens	GRTGGATYAARCCRGTGGA	2397-2415		
	For-1b	Inner	Sens	GCGGGCCTTGCCACTATTCCATGG	1410-1434	57	623
	Rev-1b	Inner	Antisens	CACGTCTTGGTGAACCCAGTGC	2011-2032		
2b:	Fext-2b	Outer	Sens	ATGGCATGGGACATGATG	1293-1310	55	4010
	Rext-2b2	Outer	Antisens	TCGAGGTCAGCTTGCAT	5286-5302		
	F-2b	Inner	Sens	TCCATGCAGGGAGCGTGGGC	1428-1447	60	583
	R-2b	Inner	Antisens	CGTTCATCCAAGTGCAGCCGAACC	1987-2010		
2r:	NS1a	Outer	Sens	ATAACGGGTCACCGCATGGCATGGGATAT	1278-1306	55	733
	R-2b	Outer	Antisens	CGTTCATCCAAGTGCAGCCGAACC	1987-2010		
	For-2r	Inner	Sens	GCAGGGGCATGGGCAAAGGTTCG	1433-1455	60	457
	NS1b	Inner	Antisens	CACCACCACGGGGCTGGGAGTGAAGCAAT	1861-1889		
3a:	Fext-3a	Outer	Sens	GCTTGGGAYATGATGATG	1296-1313	55	3566
	Rext-3a	Outer	Antisens	CGCTCCCCCTGGTCCA	4846-4861		
	For-3a-cor	Inner	Sens	CATGGTTATGTTTTTCAGGGGTCGATGC	1463-1489	55	650
	Rev-3a	Inner	Antisens	CAGGATGTTTCCTGAAGCAGTCGGTGG	2086-2112		
4a:	Fext-4a	Outer	Sens	TGATGAACTGGAGTCCAAC	1309-1327	55	1138
	Rext-4a	Outer	Antisens	AGGTAAGTGGACGTCCACG	2429-2446		
	For-4a	Inner	Sens	GCYAATTGGGCCAAAGTCATC	1437-1457	57	679
	Rev-4a	Inner	Antisens	GTCTCCGGATGCTTCCTGAA	2097-2116		
4k:	Fext-4k	Outer	Sens	CGTGGGACATGATGATGAA	1297-1315	55	902
	Rext-4k	Outer	Antisens	CGGATAGTGCCACAGTCTG	2180-2198		
	F-4k	Inner	Sens	ATGCAGGCCAACTGGGCCAAGG	1431-1452	57	656
	R-4k	Inner	Antisens	GGGCAGTTCAGGAGCCGTTG	2066-2086		

### **3.2 Caractérisation du goulot d'étranglement dans la transmission verticale du VHC.**

Il est généralement accepté que dans la TV du VIH-1 un nombre limité de variantes (1 seule dans la plupart des cas) est transmise de la mère à l'enfant et que la transmission se produit peripartum, c'est-à-dire en fin de grossesse ou lors de l'accouchement. Mais qu'en est-il du VHC? Très peu d'études ont examiné le goulot d'étranglement dans la TV du VHC. Parmi celles l'ayant fait, le nombre de séquences utilisées pour la caractérisation de la quasiespèce est très faible. Pour ce qui est du moment de transmission, la présence d'une charge virale VHC élevée chez certains enfants à la naissance et l'inefficacité de la césarienne élective à prévenir la TV suggèrent que celle-ci pourrait se produire in utero.

Dans cet article nous avons analysé 5 cas de TV du VHC. Grâce au séquençage de nouvelle génération, un profilage détaillé de la quasiespèce du VHC fut effectué chez les mères et pendant la première année de vie chez les enfants. L'analyse des données de séquençage a permis de déterminer la proportion et l'identité des variantes de la quasiespèce maternelle transmises à l'enfant. Des analyses phylogénétiques ont permis d'observer les liens évolutifs existant entre la quasiespèce de la mère et celle de l'enfant. Une estimation du moment de la transmission fut aussi effectuée grâce à des simulations de coalescence Bayésiennes. Finalement, la réponse neutralisante spécifique au VHC des mères et de leurs enfants fut évaluée par des essais de neutralisation sur des pseudoparticules VHC autologues (aVHCpp).

**Article 2: Vertical transmission of hepatitis C virus: transmission bottleneck and evidence of early in utero infection (Journal of Virology 2017, 91(23) e01372-17)**

**Contribution des auteurs :**

SFD : A effectué la majorité de la préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit et participé à la rédaction de l'article.

AL : A aidé à la préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit, fait l'analyse des données de séquençage, effectué les tests de neutralisation autologue et participé à la rédaction de l'article.

VC : A construit les réseaux phylogénétiques des variantes, effectué les estimations du moment de transmission, développé des outils bioinformatiques aidant à l'analyse des données de séquençage et participé à la rédaction de l'article.

JB : A développé des outils bioinformatiques aidant à l'analyse des données de séquençage.

CB : A effectué la validation du séquençage à haut débit par séquençage conventionnel.

DGR : A aidé à l'optimisation du système de pseudoparticules autologues.

MB : Gynécologue obstétricien et médecin traitant des patients de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS).

VL : Pédiatre infectiologue et médecin traitant des patients de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS).

NL : Pédiatre immunologue et médecin traitant des patients de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS).

IB : Gynécologues-obstétricienne et médecin traitant des patients de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS).

ALC : A mis au point le système de pseudoparticules autoogues, effectué les essais de neutralisation autologues et participé à la rédaction de l'article.

HS : Conception et supervision du projet. Rédaction de l'article.

## **Vertical transmission of hepatitis C virus: transmission bottleneck and evidence of early in utero infection**

**Authors :** Sébastien Fauteux-Daniel,<sup>a,b</sup> Ariane Larouche,<sup>a,b</sup> Virginie Calderon<sup>a,b,c</sup> Jonathan Boulais,<sup>d</sup> Chanel Béland<sup>a,b</sup> Doris G. Ransy,<sup>a,b</sup> Marc Boucher,<sup>e,f</sup> Valérie Lamarre,<sup>e,g</sup> Normand Lapointe,<sup>e,g</sup> Isabelle Boucoiran,<sup>e,f</sup> Armelle Le Campion,<sup>a,b</sup> Hugo Soudeyns,<sup>a,b,g#</sup>

### **Affiliations:**

Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada<sup>a</sup>; Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada<sup>b</sup>; Department of Informatics and Operations Research, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada<sup>c</sup>; Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada<sup>d</sup>; Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS), Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada<sup>e</sup>; Departement of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada<sup>f</sup>; Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada<sup>g</sup>.

Running Head: Bottleneck in vertical HCV transmission

#Address correspondence to Hugo Soudeyns, [hugo.soudeyns@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:hugo.soudeyns@recherche-ste-justine.qc.ca)

S.F.D., A.L, and V.C contributed equally to this work.



A.L.C. and H.S. contributed equally to this work.

Word Count: 5771 words (Text); 237 words (Abstract).

## **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 in 5 cases of vertical HCV transmission, including 3 women coinfecting with HIV-1. 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. Compatible with a loose transmission bottleneck, larger numbers of shared HCV variants were observed in presence of maternal coinfection. Coalescent Bayesian Markov chain Monte Carlo simulations revealed median times of transmission between 24.9 weeks and 36.1 weeks of gestation, with some confidence intervals ranging into the 1<sup>st</sup> trimester, hence considerably earlier than previously thought. Using recombinant autologous HCV pseudoparticles, differences were uncovered in HCV-specific antibody responses between coinfecting mothers and mothers infected with HCV alone, in whom generalized absence of neutralization was observed. Finally, shifts in HCV quasispecies composition were seen in children around 1 year of age, compatible with the disappearance of passively transferred maternal immunoglobulins and/or the development of HCV-specific humoral immunity. Taken together, these results provide insights into the timing, dynamics, and biologic mechanisms involved in vertical HCV transmission and inform preventative strategies.

## **IMPORTANCE**

Although it is well established that hepatitis C virus (HCV) can be transmitted from mother to child, the manner and the moment at which transmission operates have been the subject of conjecture. By carrying out a detailed examination of viral sequences, we showed that transmission could take place comparatively early in pregnancy. In addition, we showed that when the mother also carried human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), many more HCV variants were shared between her and child, suggesting that the mechanism and/or the route of transmission of HCV differed in presence of coinfection with HIV-1. These results could explain why cesarean section is ineffective in preventing vertical HCV transmission and guide the development of interventions to avert pediatric HCV infection.

## INTRODUCTION

Vertical transmission of HCV takes place in approximately 10% of cases (1, 2). While the risk of vertical HCV transmission is arguably lower than that of other viral pathogens such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), there are currently no effective means of preventing it: standard of care HCV treatments, including direct-acting antiviral agents, are contraindicated during pregnancy (3—5), and the effectiveness of programmed caesarean section is unclear based on best published evidence (6—9). When HCV is transmitted by contact with contaminated biological fluids, only a small fraction of the quasispecies is transmitted (transmission bottleneck) (10). In the case of HIV-1, it is well-established that only one variant is transmitted from mother to child in the large majority of cases (11—14). 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 suggested that vertical transmission of HCV may also involve a restricted number of viral variants (15—19). However, this issue has neither been comprehensively investigated nor resolved. Indeed, based on evidence of detectable HCV RNA several weeks after birth and presence in the child of HCV variants that are not contemporaneous with the maternal quasispecies at birth, it was estimated that more than one third of infected children acquired HCV by this route of transmission and up to one-half by late intrauterine and intra partum transmission (20—22). However, direct evidence for this is currently lacking. To better understand the nature of the bottleneck, HCV quasispecies dynamics based on the N-terminal portion of E2, including HVR1 and HVR2, was characterized using next generation sequencing (NGS) in

5 HCV-infected neonates and their mothers, including 3 women who were co-infected with HCV and HIV-1.

## RESULTS

**The vertical transmission bottleneck of HCV is relaxed in presence of maternal coinfection with HIV-1.** Five cases of vertical transmission of HCV were identified, with 3 of the 5 HCV-infected women also co-infected with HIV-1. Subjects and their children were followed prospectively during the course of pregnancy and childhood as per standard of care. None of the births were preterm and none of the children contracted HIV-1 infection. Clinical and sociodemographic information on study subjects is summarized in Table 1. Clinical case histories are described in Supplemental Material (Supplemental Text). Composition and structure of HCV quasispecies was studied based on analysis of the nucleic acid sequence of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene. Except for patient TVC55 (mother), whose HCV quasispecies exclusively consisted of minor variants (<25% relative frequency at any given time point), multiple major ( $\geq 25\%$  frequency) and minor HCV variants were observed in all patients, with an average of 474 variants per time point (range = 67-1490 variants) (Fig. 1A). Long-term persistence of multiple minor and major variants was observed in all but one case (TVC31-TVC32). Variant spectra tended to shift considerably between mothers and children and between successive time points, consistent with previous observations (17, 23—25). A mean of 252 variants (range = 67-438 variants) were present in the children at the first available time point after birth. In the case of child TV386, sequences from umbilical cord blood were excluded from the analysis based on the fact that it represents a different biologic compartment and possible contamination with maternal blood during

collection procedures. 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 (Fig. 1B and 1C). 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 Text). Overall, based on nucleic acid sequence identity, a total of 4 variants were shared between TVC79 (mother) and TVC80 (child), representing 0.4% of all unique variants detected in both the mother and her child. Two variants (0.2%) were shared between TVC189 (mother) and TVC190 (child), 184 (3.8%) between TVC55 (mother) and TVC56 (child), and 109 (3.6%) between TV385 (mother) and TV386 (child) (Fig. 1C). Importantly, the two mother-child pairs in whom the highest number and proportion of shared variants were recorded (*i.e.* TVC55-TVC56 and TV385-TV386) involved mothers who were co-infected with HIV-1 (Fig. 1C). In 2 out of 4 cases (TVC79-TVC80 and TV385-TV386), transmission involved both major (frequency of 25.5-97.9%) and minor (0.01-1.9%) variants. In the 2 remaining cases (TVC55-TVC56 and TVC189-TVC190), only minor variants (0.01-10.3%) were transmitted. Interestingly, while the most predominant variant in the TVC55 quasispecies (10.3%) was transmitted to the child, a major variant in the TVC189 quasispecies (54.3%) was not, suggesting no strict relationship between relative variant frequency and vertical transmission. Finally, quasispecies heterogeneity was examined at inter and intra-host levels among various time points by computing pairwise estimates of the Morisita-Horn similarity index (MHSI) (26) (Fig. 1B). Intra-host MHSI values were significantly higher than inter-host MHSI values ( $p = 0.0010$ ; Mann-Whitney U test) (Fig. 1B), indicative of rapid divergence of the child quasispecies. Taken together, these results are compatible with a tight transmission

bottleneck in vertical transmission of HCV that becomes significantly relaxed in the presence of maternal coinfection with HIV-1.

**Population structure of HCV variants and evidence of early in utero transmission of HCV.** Median-joining networks (MJN) analysis of variant spectra isolated from all 5 mother-child pairs revealed complex population structures where major and minor viral variants were extensively interweaved (Fig. 2; Supplemental Fig. 1-Supplemental Fig. 4). 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 HCV viral load in the mother and the child (Table 1). There was also comparatively reduced complexity of variant population in the TVC79-TVC80 mother-child pair, where HCV viral load was low, at least in the mother (Table 1). In the case of the TVC189-TVC190 mother-child pair, interweaving was reduced, but we cannot exclude that this was due to the fact that a single time point in the child was available for analysis. In all cases, discrete subpopulations (« variant communities ») were observed (Fig. 2; Supplemental Fig. 1-Supplemental Fig. 4). These communities were grouped around central clusters of variants that were either shared between mother and child (*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. In the case of TVC31-TVC32, the close relatedness between the two HCV quasispecies is illustrated by 5 links between mother and child variants differing by two nucleotide substitutions over the length of a segment spanning HVR1-HVR2 (Supplemental Fig. 1), in spite of the absence of shared variants and the 3.4 year time span between the last maternal time point and the first time point examined in the child. Radiations of distinct groups of variants were observed in the

TVC55-TVC56 and TV79-TVC80 mother-child pairs (Fig. 2; Supplemental Fig. 2). The 2 radiations observed in TVC55-TVC56, which could reflect directional sequence evolution, involved 9 sequences isolated from the mother and one from the child.

Globally, 0-184 shared variants were observed between mother and child, and extensive sharing patterns were seen between various time points in pregnancy going back to the 21<sup>st</sup> week of gestation in TVC55-TVC56 and TVC79-TVC80. In the case of TVC55-TVC56, 21 variants (all minor) were identified that were shared between the infant and the mother in the 2<sup>nd</sup> trimester of gestation but that were no longer found in the mother thereafter (not shown). This finding was strongly suggestive of a vertical transmission event taking place *in utero* in the middle of the 2<sup>nd</sup> trimester of gestation. To confirm this result and estimate the timing of transmission using a different analytical approach, Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) simulations were run based on HCV E2 sequence variants found in 4 of the 5 HCV-infected children. The TCV189-TVC190 mother-child pair was non-informative because only 1 time point was available for analysis in the child. In the case of TVC79-TVC80 (woman infected with HCV alone), the median timing estimate of vertical transmission was 31.1 weeks of gestation (95% high posterior density [HPD] of estimated origin values = 25.3-39.1 weeks of gestation), hence mostly within the boundaries of the 3<sup>rd</sup> trimester (*i.e.*  $\geq 28$  weeks (27)) (Fig. 3). In mothers co-infected with HIV-1, vertical transmission was estimated to have taken place on average between 17.1 and 38.3 weeks of gestation, *i.e.* between the 3<sup>rd</sup> week of the 2<sup>nd</sup> trimester and the end of the 3<sup>rd</sup> (median = 24.9 weeks, HPD = 12.8-39.1 weeks; median = 35.6 weeks, HPD = 19.4-37.6 weeks; and median = 36.1 weeks, HPD = 19.1-38.1 weeks in TVC31-TVC32, TV385-TV386, and TVC55-TVC56, respectively) (Fig.

3). The range of HPD was contained within the standard 40 weeks gestation period in all cases.

In addition, in the global quasispecies structure found in subjects TVC79-TVC80, unique minor variants found in the mother emerged from the main cluster observed in the child (Supplemental Fig. 2). Similar patterns were also observed in the TVC55-TVC56 MJN (Fig. 2). This finding raises the intriguing possibility that child-to-mother transmission of HCV (« reverse vertical ») might have occurred during pregnancy. Taken together, these results highlight extensive interspersions between viral quasispecies in the mother and the child, provide strong evidence that vertical transmission of HCV can take place *in utero*, possibly even as early as the 2<sup>nd</sup> trimester of gestation, and suggest the existence of bidirectional transmission events during pregnancy.

**Major changes in HCV quasispecies structure in the first year of life in children infected via vertical transmission.** Variation in the composition of the variant spectra was examined during the first year after birth in 3 out of 4 informative cases of vertical HCV transmission (no samples were available for child TVC190 at or around 1 year of life), with MHSI values of 0.042 (TVC32), 0.00 (TVC80), and 0.018 (TVC386) between the last time point tested and the one immediately preceding it (Fig. 1B). In the case of child TVC56, quasispecies composition remained qualitatively unchanged from age 13 days to 385 days, with paired MHSI values ranging from 0.889 to 0.999 (Fig. 1B). There was no association between age in children and quasispecies diversity expressed as Shannon entropy ( $r = 0.400$ ,  $P = 0.113$ ; Spearman correlation test), or between age and HCV viral load ( $r = -0.155$ ,  $P = 0.327$ ; Spearman correlation test). However, age in children was positively associated with ALT



and AST levels ( $r = 0.864$ ,  $P = 0.0006$ , and  $r = 0.825$ ,  $P = 0.0014$ , respectively; Spearman correlation test) (not shown). Finally, when looking at evolution of variant population structure using MJN, significant diversification started taking place in child TVC80 at 148 days of life and continued at 379 days of life, with 2 highly divergent outlier groups ( $>30$  variants,  $>14$  nucleotide substitutions over 297 bases) radiating from the central population cluster (Supplemental Fig. 2). In the case of child TVC56, a single highly divergent variant ( $>35$  nucleotide substitutions) was observed at 413 days of life (Fig. 2). Lastly, in the case of child TVC190, 2 single highly divergent variants ( $>97$  nucleotide substitutions over 297 bases) were likewise observed at 127 days of life, even though no serum samples were obtained from this child at or around 1 year of life (Supplemental Fig. 3). Taken together, these results are compatible with a model in which important changes in HCV quasispecies evolution takes place during the first year of life in children who acquired HCV infection via vertical transmission.

**Dynamics of HCV-specific neutralizing antibody responses in children during the first year of life.** To assess the potential influence of HCV-specific neutralizing antibody responses on vertical transmission of HCV and evolution of the HCV variant profile in HCV infected women and children, series of recombinant autologous HCV pseudoparticles (aHCVpp) were produced based on amino-acid sequences of major ( $\geq 25\%$  frequency) and minor ( $< 25\%$  frequency) HCV variants that were observed in the mother and/or the child and that were transmitted from mother to child or not. Eight different aHCVpp stocks were produced for the TVC55-TVC56 mother-child pair, 4 for TVC79-TVC80, 3 for TVC189-TVC190, and 7 for TV385-TV386 (Supplemental Fig. 5). None were produced for TVC31-TVC32, as the last maternal serum sample obtained from the mother was 3.4 years before

delivery of the child as a result of loss to follow-up. Assessment of infectivity revealed that while most aHCVpp were clearly infectious, some were markedly less than those expressing the corresponding native envelope proteins (E2 from subtypes 1a, 1b, and 4) (28, 29) (Supplemental Fig. 5). Longitudinal analysis of the neutralization of each aHCVpp and HCVpp expressing original envelope proteins was performed using Ig purified from serum samples obtained from study subjects at each time point. None of the sera from TVC79 and TVC189, two women who were infected with HCV only, were able to neutralize any of the aHCVpp tested, including some that were engineered based on sequences derived from major, minor, transmitted and non-transmitted variants (Fig. 4A and 4B). Serum from child TVC190 at 127 days of age was also unable to neutralize any of the aHCVpp tested. In the case of child TVC80, sera obtained at 43 and 148 days of life were also unable to neutralize any of the aHCVpp. However, neutralizing activity directed against all variants was observed at 379 days of life, with levels of neutralization nearing 100% inhibition. This activity was also directed against variant 79V2, that was detected at low frequency in the mother 8 days before delivery, at high frequency at 43 and 148 days of life in the child, but that was no longer detected at 379 days of life (last time point). Variant 79V2 was part of the outlier group when the variant population structure was examined (*i.e.* it was not at the root of further radiations) (Supplemental Fig. 6), suggesting that it represented an evolutionary dead end.

In contrast, sera obtained from TVC55, who was coinfecting with HCV and HIV-1, were capable of neutralizing all aHCVpp tested at levels close to those obtained with controls. Sera from her child (TVC56) were also capable of efficient neutralization at 13 and 27 days of life, but this activity was largely lost at 385 days of life, including that directed against control HCVpp (Fig. 4C). Finally, serum Ig isolated from TV385 (coinfecting with HCV and HIV-1)

shortly before delivery was able to efficiently neutralize 5 different minor variants (transmitted or non-transmitted), but not a major transmitted variant (385V1) and a minor non-transmitted one (385V3). Serum Ig isolated from child TV386 at birth (cord blood) and 30 days of age were likewise inefficient at neutralizing 385V1 and 385V3. Interestingly, neutralizing activity directed against 385V1 (transmitted variant) emerged at 366 days of age, while activity against 385V3 (variant only found in cord blood) disappeared and activity directed against other previously neutralized minor transmitted variants (385V6 and 385V7) declined (Fig. 4D). Again, like in the case of variant 79V2 in TVC79-TVC80, variants 385V6 and 385V7 were not at the root of further radiations, hence possibly representing taxa that were headed towards immune-driven extinction (Supplemental Fig. 7). At or around 1 year of life, children TVC80 and TV386 showed significant neutralizing antibody responses concomitant with comparatively important changes in HCV quasispecies composition (MSHI = 0 between 148 and 379 days of age in child TVC80, and MHSI = 0.018 between 30 and 366 days in child TV386). Conversely, an absence of neutralizing activity was observed in child TVC56, correlating with stable E2 quasispecies composition (MSHI = 0.997 between 27 and 385 days of age). Taken together, these results showed differential patterns of E2-specific neutralizing Ig responses between mothers infected with HCV alone and mothers coinfecting with HCV and HIV-1. In addition, they suggest that after the decline of circulating HCV-specific Ig that were transferred from the mother, children TVC80 and TV386 developed their own HCV-specific humoral immune responses resulting in major shifts in HCV quasispecies.

## DISCUSSION

HCV is found as a quasispecies in its host, which contributes to immune escape and the establishment and maintenance of chronic infection (30, 31). Transmission between hosts is 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 (10, 32—35). Here we examined the transmission bottleneck in the context of vertical transmission of HCV by studying evolution and identity of N-terminal nucleic acid sequences of E2 using NGS in 5 cases of vertical transmission of HCV. Unexpectedly, our results provided direct evidence that vertical transmission of HCV can in some cases involve an extensive number of distinct viral variants. This was particularly striking in the case of the TVC55-TVC56 and TV385-TV386 mother-child pairs, where respectively 184 and 109 maternal variants were identified in the child. Both TVC55 and TV385 mothers 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 (1, 36, 37). It has been speculated that interference of HIV-1 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 observed enhancement in transmission rates (1, 2, 37, 38). HIV-1 infection in pregnancy was also associated with the development of chorioamnionitis (39—41), an inflammatory condition that 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.

Examination of HCV variant population structure in the mothers and the children using MJN analysis revealed a complex picture of variable but generally extensive interconnectedness

between variant spectra. In TVC55-TVC56 and TVC79-TVC80, lengthy radiations of discrete groups of variants were observed that could be compatible with directional evolution, possibly associated with differential replicative fitness and/or viral escape from host humoral and/or cell-mediated immune responses. In addition, in these two mother-child pairs, variant nucleic acid sequence identity suggested that vertical transmission of HCV could have taken place during the 2<sup>nd</sup> trimester of gestation. Evidence for that was strongest in the case of TVC55-TVC56, where 21 variants shared between mother and child were no longer found in the mother in the 3<sup>rd</sup> trimester of pregnancy. These results were largely confirmed using Bayesian MCMC simulations, a different analytical approach though one that was based on the same NGS dataset. In the case of the TVC31-TVC32 mother-child pair, the HPD range extended as early as 12.8 weeks of gestation, *i.e.* within the boundaries of the 1<sup>st</sup> trimester. Although *in utero* transmission of HCV has been proposed before based on indirect evidence, this range of estimates extends considerably earlier in pregnancy than previously thought (20, 21, 42). Early *in utero* transmission might explain the lack of consistency observed in published reports as to the efficacy of programmed caesarean section in reducing the risk of vertical transmission of HCV (6—9). It might also have significant implications regarding HCV pathogenesis, as the presence of circulating HCV in the fetus during this time period could lead to long term tolerance to HCV antigens and loss of pathogen-specific immune competence (43, 44). Indeed, 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 vertical transmission (19, 45). Finally, examination of variant population structure in the TVC55-TVC56 and the TVC79-TVC80 mother-child pairs also provided compelling but circumstantial evidence (*i.e.* maternal variants emerging from child clusters) that transmission of HCV from the fetus to the mother could also have taken place

during pregnancy, similar to what was recently hypothesized to occur in maternofoetal infection by Zika virus (46). The significance of this finding would be strengthened by studies on additional cases of vertical transmission. It is well-established that cells of fetal origin can be found in the maternal circulation during pregnancy (maternal microchimerism), where they can even establish long-term residence (47). Hence, it is clearly conceivable that free HCV virions, immune complexes, and/or cell-associated HCV (48) of fetal origin could find their way back into the maternal periphery.

Our investigation of quasispecies diversity and dynamics in children revealed that a major shift in the composition of the variant spectra took place at or around 1 year of life in 3 of 4 informative cases. This observation could be compatible with waning levels of maternal HCV-specific Ig in the children's circulation, concomitant with a rise in the children's own antibody responses, leading to a shift in selective pressure exerted on the E2 envelope protein. Indeed, children TVC80 and TV386, who exhibited low MHSI values between the latest time point and the one directly preceding it, also showed significant neutralizing Ig responses at around 1 year of age, whereas late serum from child TVC56, with a paired MHSI of 0.889 between 210 and 385 days of age, neutralized none of the variants tested. The apparent failure to develop HCV-specific neutralizing Ig responses in child TVC56 could also be compatible with immune tolerance to HCV brought about by early *in utero* exposure to viral antigens (19, 43, 44, 49). Testing of neutralizing activity in sera from women and children also revealed that sera from women infected with HCV alone exhibited no neutralizing activity and that no such activity appeared to have been transferred to their children, a mechanism that should have contributed to protecting the fetus from microbial infections (50). Conversely, sera from coinfecting women exhibited strong neutralizing activity and this

activity was also found in sera from their children, at least in early life. This is counterintuitive, as it is established that coinfection with HIV-1 dampens/interferes with HCV-specific humoral and cell-mediated immunity (51, 52). One possible explanation would be that there are in fact two non-mutually exclusive routes/mechanisms by which HCV can be transmitted from mother to child. The first one could be associated with a lack of maternal HCV-specific neutralizing Ig responses and/or lack of transference of HCV-specific neutralizing Ig to the child, leading to HCV transmission and a tight transmission bottleneck, as seen in the TVC79-TVC80 and TVC189-TVC190 mother-child pairs. The second route of transmission, observed in cases of maternal coinfection with HIV-1, could be related to HIV-associated placental inflammation (chorioamnionitis; micro-haemorrhages), potentially resulting in transfer of large spectra of major and minor variants to the fetus (loose bottleneck), even in the presence of a potentially effective maternal HCV-specific neutralizing Ig response, as observed in the TVC55-TVC56 and TV385-TV386 mother-child pairs. However, none of the women in the study presented with macroscopic or histological signs of placental pathology (Supplemental Text).

Limitations of this study include the fact that we only had the chance to examine a handful of cases of HCV vertical transmission. In addition, our NGS analysis was limited to segment of 297 nucleic acid residues. Because of this, even though this portion of E2 contains the most genetically diverse region of the entire HCV genome and is thus highly informative in the context of quasispecies analysis, our results would 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 (33, 34, 53), which we were unable to perform 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 (54). Understandably, liver biopsies from pregnant women and infants enrolled in our study could not ethically be procured.

Person-to-person transmission of HCV and HIV-1, two viruses with similar sized genomes but with diametrically different biological properties and pathogenesis, usually involves tight bottlenecks, and founder effects are commonly observed in the recipient's viral population structure (10, 33—35, 55, 56). This was generally thought to be the case in vertical transmission as well (11—14, 16, 19, 32). However, the present report paints a contrasting picture. Instead of a mostly perinatal mode of transmission, tight transmission bottleneck, and presence of single founder variants, direct evidence was provided for transmission taking place comparatively early in pregnancy (*i.e.* mid-gestation), for transmission of multiple variants under conditions that include maternal coinfection with HIV-1, and for possible bidirectional transfer of viral variants across the placental divide. 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, it should be taken into account if and when designing prophylactic regimens for neonates using antiviral agents with activity against HCV, as single-dose peripartum protocols analogous to those using nevirapine in HIV-1 infection (57, 58) could prove ineffective. Our findings also support the recommendations for pre-conception treatment for HCV infected women.



## **MATERIALS AND METHODS**

**Study subjects.** Between 2010 and 2016, 55 pregnant women infected with HCV or co-infected with HCV and HIV-1 have been enrolled in the Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) Mother-Child Cohort at Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine, Montreal, Canada, where the study was conducted. Five cases of mother-to-child HCV transmission have been diagnosed. First, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy were defined as 1-13, 14-27, and  $\geq 28$  weeks of gestation and gestational age was estimated based on 1<sup>st</sup> trimester ultrasound or best available data (27). 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). HCV plasma RNA levels were quantified using the COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test version 2.0 (Roche). HIV-1 viral load was measured using the VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (Bayer), with a lower limit of detection of 1.70 log<sub>10</sub> HIV-1 RNA copies/ml plasma. Levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured on a Synchron LX20 system (Beckman Coulter). CD4<sup>+</sup> 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.

**Viral RNA extraction and amplification.** Viral RNA was extracted from serum samples using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) 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 Maxima RT (Thermo

Scientific). Nucleic acid segments encoding the N-terminal portion of E2, including HVR1 and HVR2 (nucleotide positions 1491-1787 of the H77 isolate) (59, 60) were amplified by nested PCR using a proofreading polymerase (Phusion, New England BioLabs). 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 Table 1. PCR conditions for first- and second-round reactions were 30 sec denaturation (98°C), followed by 35 cycles of 15 sec denaturation (98°C), 30 sec hybridization (S1 Table), and 20 sec elongation (72°C), and a final extension step of 10 min at 72°C.

**Next generation sequencing.** PCR products were purified using DNA magnetic beads (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter) at a ratio of 0.65:1, which was empirically determined to be the most resolving for fragments in the 600-700 bp range using the AMPure XP calibration protocol and a 2100 Bioanalyzer (Waldbronn, Germany) (not shown). Purified PCR product were quantified using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies) and were multiplexed in an equimolar pool ( $6 \times 10^{-13}$  mol/product). Unidirectional pyrosequencing (Lib-l sequencing) was performed on a GS FLX+ Instrument (454 Sequencing, Roche) using Titanium Series reagents (McGill University/Genome Quebec Genome Center). Error rates were estimated by sequencing corresponding amplicons obtained using the phCMV-E1E2 plasmid (28) and HCV genotype 1a primers (Supplemental Table 1).

**Analysis of nucleic acid sequence data.** After de-multiplexing, sequences <360 nucleic acid residues were filtered using a local implementation of Galaxy (61). Resulting sequences were aligned on the basis of forward primer sequences (Seq\_pattern.py Python script available from the authors upon request). Sequences were then manually sorted using MEGA version 6.0 (62) to exclude homopolymer-related frameshifts resulting from pyrosequencing errors and PCR artifacts. After quality control, a total of 99,613 sequences were obtained, representing an average of 9,961 sequences per subject (range = 2,131-25,296 sequences) and an average of 4,331 sequences per time point (range = 623-11,270 sequences). 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 using Apache OpenOffice 4.1.1. 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 at the nucleic acids level was examined by computing the MHSI (26), as implemented in EstimateS version 9.1.0 (63).

**Network analysis.** For some mother-child pairs (i.e. TVC55-TVC56; TVC189-TVC190; TV385-TV386), the dataset of unique variants was reduced using DNACLUSt release 3 (64) with a similarity threshold. This was done to compensate for computational limitations of the MJN-generating program (see below). For each resulting cluster, a random sequence was

chosen to represent that cluster in a FASTA file taking into account cluster size (number of variants in the cluster). In the case of the TCV31-TVC32 and TVC79-TVC80 mother-child pairs, all variant were kept in the analysis. The FASTA file was converted to RDF format using DnaSP version 5 (65). MJN (66) were then computed using Network version 4.612 and drawn using Network Publisher version 2.0.0.1 (Fluxus Technology), with epsilon = 0, no star-contraction, and post-processing simplification.

**Determination of the time of transmission.** Coalescent Bayesian MCMC simulations were computed with BEAST v2 (67) to estimate the timing of vertical transmission using a combination of probability models, gene trees, and Bayesian statistical framework. Analysis was conducted under the HKY substitution model using a birth-death-sequential-sampling model or an extended Bayesian skyline plot (only for child TVC32). As the timeframe of our sampling was relatively short, a mean value of  $1.44 \times 10^{-2}$  substitution/site/year was sourced from the literature (68) to provide an informative prior on the ucl.d.mean parameter (*i.e.* the average rate of the molecular clock per site per day). For each child, 20 chains were run assuming an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock that allows the rate of evolution to vary across the tree using 400 million steps. Mixing and convergence (*i.e.* effective sample size > 200 for all parameters) were assessed in Tracer v1.6 (69) and only chains reaching stationarity were kept. The LogCombiner v1.7.5 tool (70) was then used to combine the chains. The first 10% of the chains were discarded (burn-in period) and resampled.

**Production of autologous HCV pseudoparticles (aHCVpp) and neutralization assays.** Site-directed mutagenesis was used to introduce a *StuI* restriction site (nucleotide position 3180) into the pCMV-7a expression vector encoding HCV E1 and E2 glycoproteins of

genotype 1a, strain H77 (phCMV1a-RSE1E2 vector) (28). The segment encoding the 3 C-terminal amino acids residues of E1 and the 161 N-terminal amino acid residues of E2 was then excised by digestion with *StuI* and *SalI* (*SalI* site at nucleotide position 2872). Two restriction sites (*Eco72I* [nucleotide position 1858] and *PaeI* [nucleotide position 3552]) were silenced in the phCMV vector encoding HCV genotype 4 E1E2 glycoproteins (UKN4.11.1) (29) to leave unique *Eco72I* and *PaeI* restriction sites at positions 3260 and 2713, respectively (phCMV4-RSE1E2 vector). One *BamHI* site (nucleotide position 1425) was silenced in the phCMV-vector encoding HCV genotype 1b envelope proteins (UKN1B12.6) (29), leaving unique *BamHI* (nucleotide position 2637) and *EheI* (nucleotide position 3190) restriction sites (phCMV1b-RSE1E2 vector). The regions including HVR1 were then excised replaced with autologous E2 sequences produced by gene synthesis (GeneArt Strings, Life Technologies). The structure of all constructs was verified by DNA sequencing. HCVpp were produced as previously described (28). Briefly, recombinant constructs (ph-CMV1a-RSE1E2, phCMV4-RSE1E2 or phCMV1b-RSE1E2 vectors) expressing autologous HVR1 E2 segments were transfected into HEK293T cells (American Type Culture Collection) along with the murine leukemia virus (MLV) Gag-Pol packaging construct (phCMV-MLV) and the MLV-based phCMV-Luc vector encoding the luciferase reporter protein. After 48h, aHCVpp-containing supernatants were collected and used in infection assays. As a negative control and to take into account the level of nonspecific endocytosis, E1E2 insert was removed from the phCMV-7a vector to generate aHCVpp expressing no E1 and E2 glycoproteins (phCMV1a- $\Delta$ E1E2 vector). For neutralization assays, immunoglobulins (Ig) were first purified from HCV uninfected (Ig control) or infected (Ig test) subject sera with recombinant protein A/G spin columns (Thermo Fisher Scientific). aHCVpp were pre-incubated with purified Ig at a concentration of 0.5 mg/ml during 1h at 37°C and then used

to infect Huh7.5 human hepatocellular carcinoma cells (provided by Dr. Tatsuo Takahashi, Health Science Research Resources Bank, Japan) for 5h (E2 1a-RSE1E2 and E2 1b-RSE1E2 aHCVpp) or 8h (E2 4-RSE1E2 aHCVpp), after which cells were incubated in regular medium for 72h. The broadly neutralizing human monoclonal antibody AR3B was used as positive control for neutralization (71). Infectious titers were determined by measuring luciferase activity using a Mithras LB 940 luminometer (Berthold Technologies). Results were expressed as percentages of neutralization for each aHCVpp that were calculated and adjusted for nonspecific endocytosis as follows:  $100 - ([\text{aHCVpp RSE1E2 Ig test} - \text{aHCVpp } \Delta\text{E1E2 Ig test}] / [\text{aHCVpp RSE1E2 Ig control} - \text{aHCVpp } \Delta\text{E1E2 Ig control}]) \times 100$ . Efficient neutralization was defined as  $\geq 50\%$  reduction of luciferase activity. All serum samples and RS-E1E2 aHCVpp from each mother-child pairs were tested simultaneously to offset inter-experimental variation. Each experiment was performed twice independently, and in each case, every condition was tested in triplicate.

**Statistical analysis and data deposition.** Statistical significance of differences between groups was tested using the Mann-Whitney U test. Associations between clinical and experimental parameters were tested using the Spearman correlation test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v. 6.07 (GraphPad Software). All sequence data were deposited in GenBank (accession numbers: KY178337 - KY189053).

**Ethics statement.** 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. Parents/guardians provided written informed consent on behalf of all child participants.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Martine Caty and Silvie Valois for expert technical support, François-Loïc Cosset, INSERM U1111, ENS Lyon, France, for providing the phCMV-E1E2 vector, Mansun Law, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, for kindly providing the AR3B monoclonal antibody, and Zabrina Brumme, Simon Fraser University, Vancouver, BC, for critical reading of the manuscript. Supported by grants no. HOP-98831 and HOP-131561 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and by an infrastructure grant from 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. I.B. is a Junior 1 Clinical Research Fellow of FRQS. The funders had no role in study design, data collection or interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## REFERENCES

1. 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.
2. Le Champion A, Larouche A, Fauteux-Daniel S, Soudeyns H. 2012. Pathogenesis of hepatitis C during pregnancy and childhood. *Viruses* 4:3531—3550.
3. Kilham L, Ferm VH. 1977. Congenital anomalies induced in hamster embryos with ribavirin. *Science* 195:413—414.

4. 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.
5. Toussaint-Miller KA, Andres J. 2015. Treatment considerations for unique patient populations with HCV genotype 1 infection. *Ann Pharmacother* 49:1015—1030.
6. 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* 356:904—907.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.



12. 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.
13. 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.
14. Russell ES, Kweek 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 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 Fetal Neonatal Ed* 90:F156—160.
  22. 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.
  23. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288:339—344.
  24. Farci P, Strazzer 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.
25. 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.
  26. Horn HS. 1996. Measurement of "overlap" in comparative ecological studies. *Am Naturalist* 100:419—424.
  27. Butt K, Lim K; Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. 2014. Determination of gestational age by ultrasound. *J Obstet Gynaecol Can* 36:171—183.
  28. 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.
  29. Lavillette D, Tarr AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, Patel AH, Dubuisson J, Ball JK, Cosset FL. 2005. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 41:265—274.
  30. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66:3225—3229.
  31. Farci P, Purcell RH. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 20:103—126.
  32. 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* 19:1529—1533.

33. 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:e1002880.
34. 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* 87:13609—13618.
35. 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* 86:11956—11966.
36. 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* 178:1047—1052.
37. Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ. 2014. Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 59:765—773.
38. 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* 44:1123—1131.

39. 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* 163:1134—1138.
40. 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* 172:700—705.
41. 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* 18:1357—1364.
42. Prasad MR, Honegger JR. 2013. Hepatitis C virus in pregnancy. *Am J Perinatol* 30:149—159.
43. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603—606.
44. 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* 322:1562—1565.
45. 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. *Inf Gen Evol* 20:465—470.
46. Suy A, Sulleiro E, Rodó C, Vázquez É, Bocanegra C, Molina I, Esperalba J, Sánchez-Seco MP, Boix H, Pumarola T, Carreras E. 2016. Prolonged Zika virus viremia during pregnancy. *New Engl J Med* 375:2611—2613.

47. Jeanty C, Derderian SC, Mackenzie TC. 2014. Maternal-fetal cellular trafficking: clinical implications and consequences. *Curr Opin Pediatr* 26:377—382.
48. 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* 80:65—71.
49. 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* 203:196—206.
50. Simister NE. 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21:3365—3369.
51. Kim AY, Schulze zur Wiesch J, Kuntzen T, Timm J, Kaufmann DE, Duncan JE, Jones AM, Wurcel AG, Davis BT, Gandhi RT, Robbins GK, Allen TM, Chung RT, Lauer GM, Walker BD. 2006. Impaired hepatitis C virus-specific T cell responses and recurrent hepatitis C virus in HIV coinfection. *PLoS Med* 3:e492.
52. Bailey JR, Dowd KA, Snider AE, Osburn WO, Mehta SH, Kirk GD, Thomas DL, Ray SC. 2015. CD4+ T-cell-dependent reduction in hepatitis C virus-specific neutralizing antibody responses after coinfection with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 212:914—923.
53. 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* 43:406—413.

54. 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* 71:1732—1734.
55. Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 261:1179—1181.
56. Tully DC, Ogilvie CB, Batorsky RE, Bean DJ, Power KA, Ghebremichael M, Bedard HE, Gladden AD, Seese AM, Amero MA, Lane K, McGrath G, Bazner SB, Tinsley J, Lennon NJ, Henn MR, Brumme ZL, Norris PJ, Rosenberg ES, Mayer KH, Jessen H, Kosakovsky Pond SL, Walker BD, Altfeld M, Carlson JM, Allen TM. 2016. Differences in the selection bottleneck between modes of sexual transmission influence the genetic composition of the HIV-1 founder virus. *PLoS Pathog* 12:e1005619.
57. 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* 354:795—802.
58. 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* 362:859—868.

59. 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* 180:842—848.
60. Kato N, Ootsuyama Y, Tanaka T, Nakagawa M, Nakazawa T, Muraiso K, Ohkoshi S, Hijikata M, Shimotohno K. 1992. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res* 22:107—123.
61. 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:R86.
62. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725—2729.
63. Colwell RK. 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. 2013. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
64. Ghodsi M, Liu B, Pop M. 2011. DNACLUST: accurate and efficient clustering of phylogenetic marker genes. *BMC Bioinformatics* 12:271.
65. Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451—1452.
66. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. 1996. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37—48.
67. Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol* 10:e1003537.



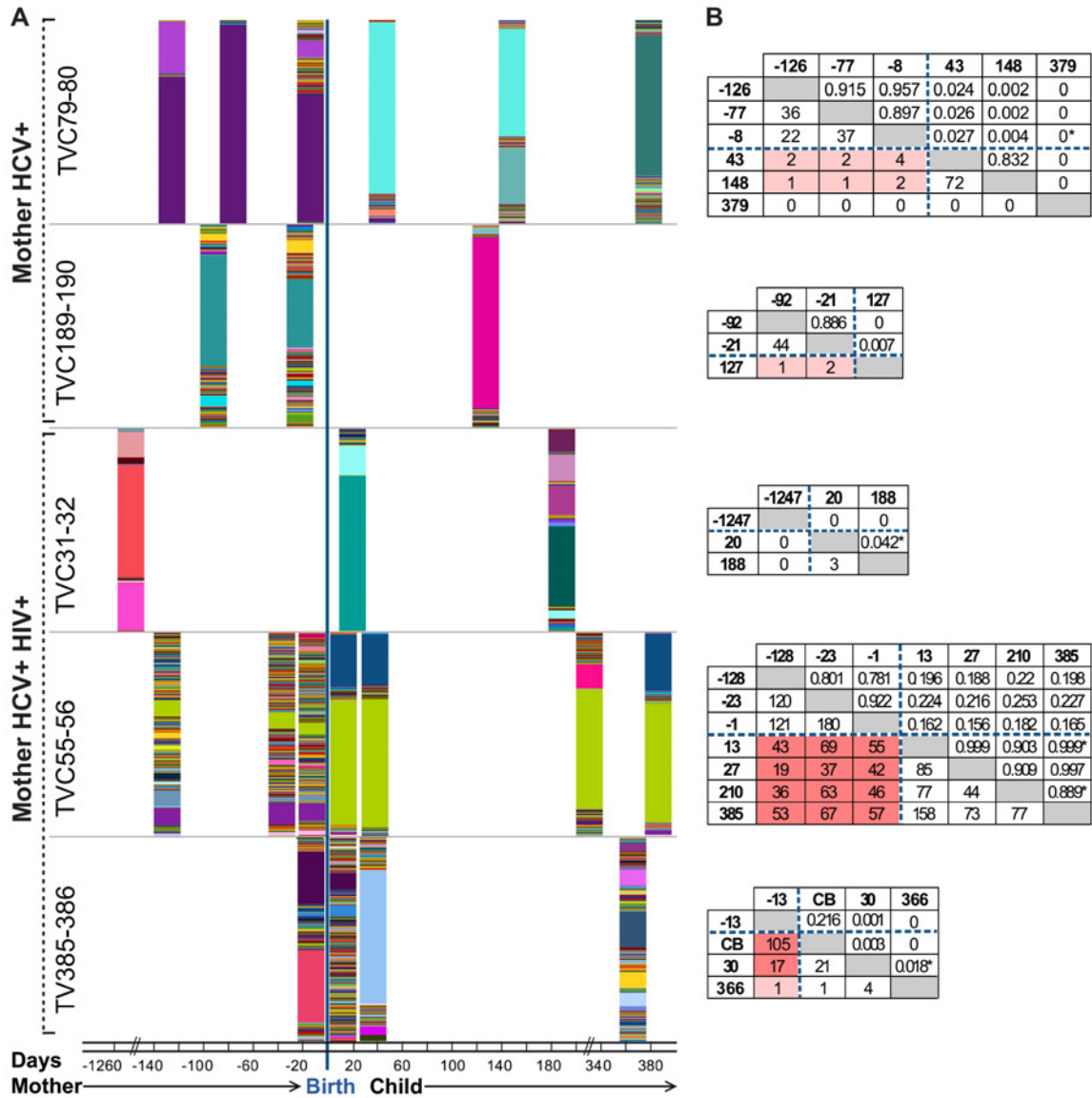
68. Sede M, Roberto L, Moretti F, Laufer N, Quarleri J. 2014. Inter and intra-host variability of hepatitis C virus genotype 1a hypervariable envelope coding domains followed for a 4 – 11 year of human immunodeficiency virus coinfection and highly active antiretroviral therapy. *Virology* 471-473:19—28.
69. Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2014. Tracer v1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
70. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29:1969—1973.
71. Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton DR. 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14:25—27.

## TABLES AND FIGURES

**Table 1: Clinical information on study subjects**

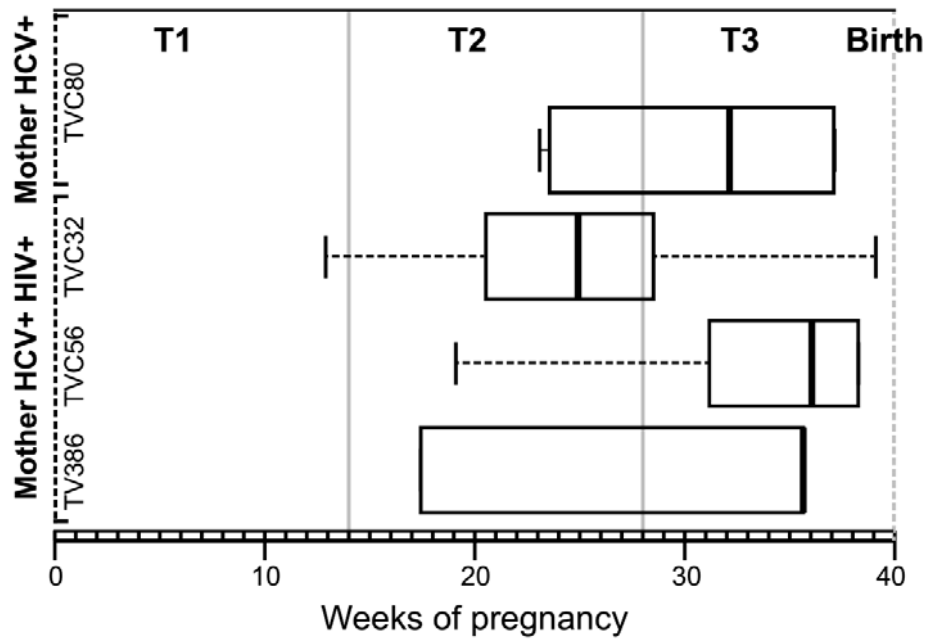
Subject	Time to/from birth (days)	HCV genotype	HCV viral load (IU/ml)	ALT (IU/ml)	AST (IU/ml)	HIV-1 viral load (RNA copies/ml)	CD4 count (cells/mm <sup>3</sup> )	Antiretroviral agents	Maternal age at delivery (years)	Gestational age (weeks)	Delivery mode
TVC31*	-1247	1b	168,561	38	42	nd	252	AZT/3TC	30.6	38.0	Vaginal
TVC32	+20 +188	1b	69,327	nd 51	nd 76	TND TND	nd 2,438	AZT/3TC nt			
TVC55*	-128 -23 -1	1a	5,220,000 1,910,000 1,164,600	20 19 26	22 29 39	377 <50 <50	620 612 576	nt nt AZT	33.5	40.1	Vaginal
TVC56	+13 +27 +210 +385	1a	1,458,222 48,164,730 5,849,226 8,263,263	23 28 341 119	31 31 256 88	TND TND TND TND	nd nd 2,303 nd	AZT/3TC/NFV AZT/3TC/NFV nt nt			
TVC79	-126 -77 -8	1a	259,000 109,000 301,000	44 21 18	35 22 25	TND TND TND	nd nd 340	nt nt nt	36.0	38.2	Vaginal
TVC80	+43 +148 +379	1a	21,000,000 12,975,960 2,160,000	18 41 83	26 49 75	TND TND TND	nd nd nd	nt nt nt			
TVC189	-92 -21	4a	2,090,000 1,648,623	86 62	81 49	TND TND	nd nd	nt nt	35.2	37.3	Vaginal
TVC190	+127	4a	1,417,668	50	63	nd	nd	nt			
TV385*	-13	1b	13,400,000	19	20	2,400	2,400	nd	26.2	39.0	Vaginal
TV386	0 +30 +366	1b	17,406 1,387,992 1,003,509	14 25 87	41 39 101	nd TND TND	nd nd nd	AZT/3TC AZT/3TC nt			

Patient identifiers for mothers include odd numbers, while even numbers denote children. \*Denotes maternal coinfection with HIV-1. nd: Not determined; TND: Target not detected; nt: Not treated; AZT: Zidovudine; 3TC: Lamivudine; NFV: Nelfinavir.

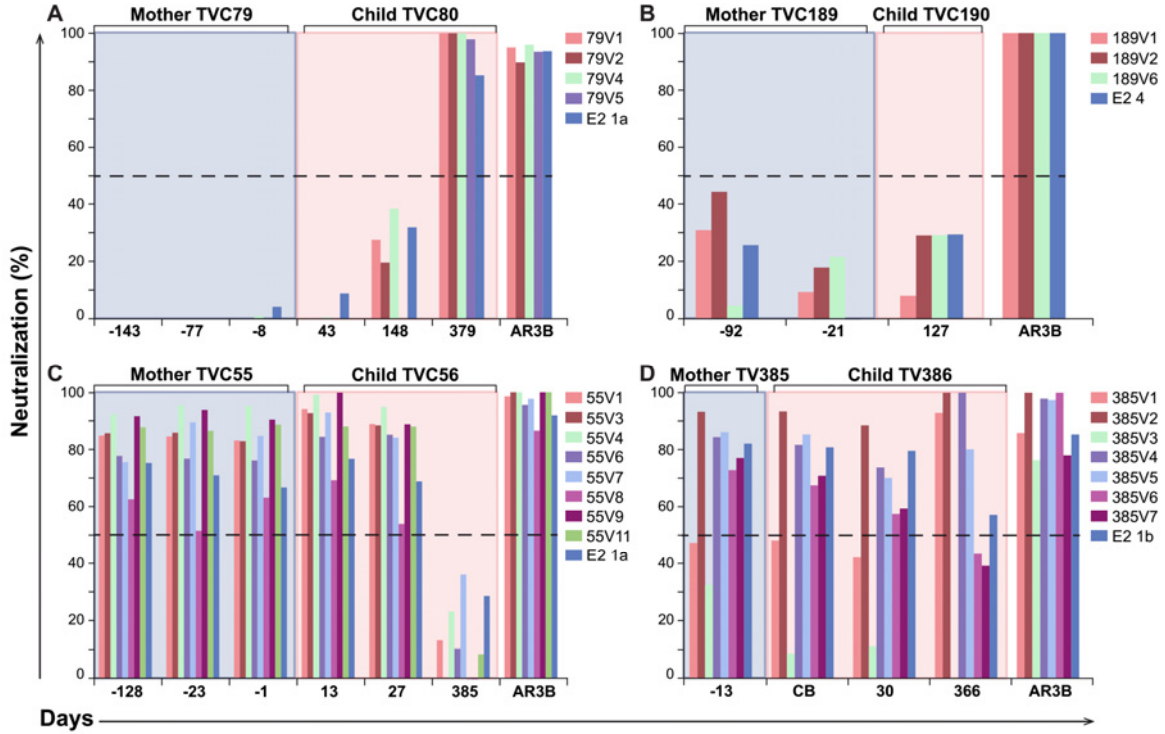


**FIG 1. Longitudinal analysis of HCV quasispecies diversity in 5 cases of vertical transmission.** A. Color-coded variant spectra based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene (nucleotide positions 1491-1787, except in the case of the TVC189-TVC190 mother-child pair, where nucleotide positions were 1491-1790). The vertical blue 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 and even numbers denote children. Each color represents a unique variant in longitudinal analysis of individual mother-child pairs but not in





**FIG 3: Timing of vertical HCV transmission.** The timing of vertical transmission was estimated using coalescent Bayesian MCMC simulations, as described under Materials & Methods. For each child, the 95% high posterior density (HPD) of estimated origin values are illustrated with dashed lines. Median, first and third quartiles are indicated. First, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy were defined as 1-13, 14-27, and  $\geq 28$  weeks of gestation (27).



**FIG 4. Neutralizing activity directed against autologous HCV pseudoparticles in serial sera from HCV-infected women and their children.** Neutralizing activity directed against aHCVpp engineered with autologous N-terminal E2 fragments was tested using Ig fractions purified from sera from study participants, as described under Materials & Methods. aHCVpp produced using sequences derived from major variants and minor variants that were transmitted or not were tested (Supplemental Fig. 5), along with HCVpp produced using constructs encoding native HCV-1a, HCV-1b and HCV-4 envelope proteins (E2 1a, E2 1b, E2 4). The AR3B broadly neutralizing human monoclonal antibody (71) was used as positive control. Efficient neutralization was defined as  $\geq 50\%$  reduction of luciferase activity (dashed horizontal line). A-B, mother infected with HCV only. C-D, mother co-infected with HCV and HIV. Results are shown as percentages of neutralization obtained from one representative experiment for each mother-child pair.

**Supplemental Text: Brief clinical case histories of 5 cases of mother-to-child transmission of HCV, Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) Cohort, CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada.**

**TVC31-TVC32.** TVC31, a Caucasian woman, was coinfecting with HCV (genotype 1b) and HIV-1 (clade unknown) became pregnant at the age of 31 years. She received antiretroviral therapy and her HIV-1 viral load was below the limit of detection (<500 RNA copies per ml of plasma) 2 weeks before delivery. Her pregnancy was complicated by nephrolithiasis. Because of that condition she was induced at 38 weeks of gestation. She delivered of a baby girl (TVC32), APGAR 8-9-9, who weighed 2.400 kg at birth. The infant was administered antiretroviral prophylaxis (zidovudine, lamivudine and nelfinavir) for 6 weeks starting in the first 8-12 hours of life, and had to be weaned of methadone as the mother was using it throughout pregnancy. TVC32 did not contract HIV-1 infection but had serologic and molecular evidence of infection with HCV (repeatedly PCR positive). However, she spontaneously cleared HCV infection, as she was twice found to be negative by nucleic acids testing at the age of 1.7 years.

**TVC55-TVC56.** TVC55, a Caucasian woman coinfecting with HCV (genotype 1a) and HIV-1 (clade B) had an uncomplicated pregnancy on combination antiretroviral therapy at the age of 33 years. Her HIV-1 viral load was below the limit of detection (<50 RNA copies per ml of plasma) 2 weeks before delivery. She was given intravenous AZT during labor, and had a spontaneous vaginal delivery at 40 weeks. There were no macroscopic or histological signs of placental pathology. Child TVC56 was a baby girl and weighed 3.030 kg at birth with APGAR scores of 9-9-9. She was administered antiretroviral prophylaxis

(zidovudine, lamivudine and nelfinavir) for 6 weeks starting in the first 8-12 hours of life. TVC56 did not contract HIV-1 infection but had serologic and molecular evidence of infection with HCV (repeatedly PCR positive) until 7.9 years of age, when HCV viral load became undetectable (<50 RNA copies per ml of plasma). TVC56 was subsequently lost to follow-up.

**TVC79-TVC80.** TVC79, a Caucasian woman chronically infected with HCV (genotype 1a) but not with HIV-1, had an uncomplicated pregnancy at the age of 36 years. She had a spontaneous vaginal delivery at 38 weeks of gestation. There were no macroscopic or histological signs of placental pathology. Child TVC80 was a baby girl and weighted 2.325 kg at birth with APGAR scores of 6-8-8. Child TVC80 was repeatedly found to be PCR-positive for HCV until now (13 years of age), with her most recent viral load at 2,628,454 UI/ml (6.42 log<sub>10</sub>).

**TVC189-TVC190** TVC189, a woman of Egyptian origin who was chronically infected with HCV (genotype 4a) but not with HIV-1, had at the age of 35 years a pregnancy complicated by cholestasis. She was induced because of cholestasis and had a spontaneous vaginal delivery at 37 weeks of gestation. There were no macroscopic or histological signs of placental pathology. Child TVC190, a baby girl, weighed 2.350 kg at birth with APGAR scores of 8-9-9. She was repeatedly found to be PCR-positive for HCV until the age of 3.1 years, when she was lost to follow-up.

**TV385-TV386.** TV385, a woman coinfecting with HCV (genotype 1b) and HIV-1 (clade unknown), had at age 26 years a pregnancy complicated by drug abuse throughout

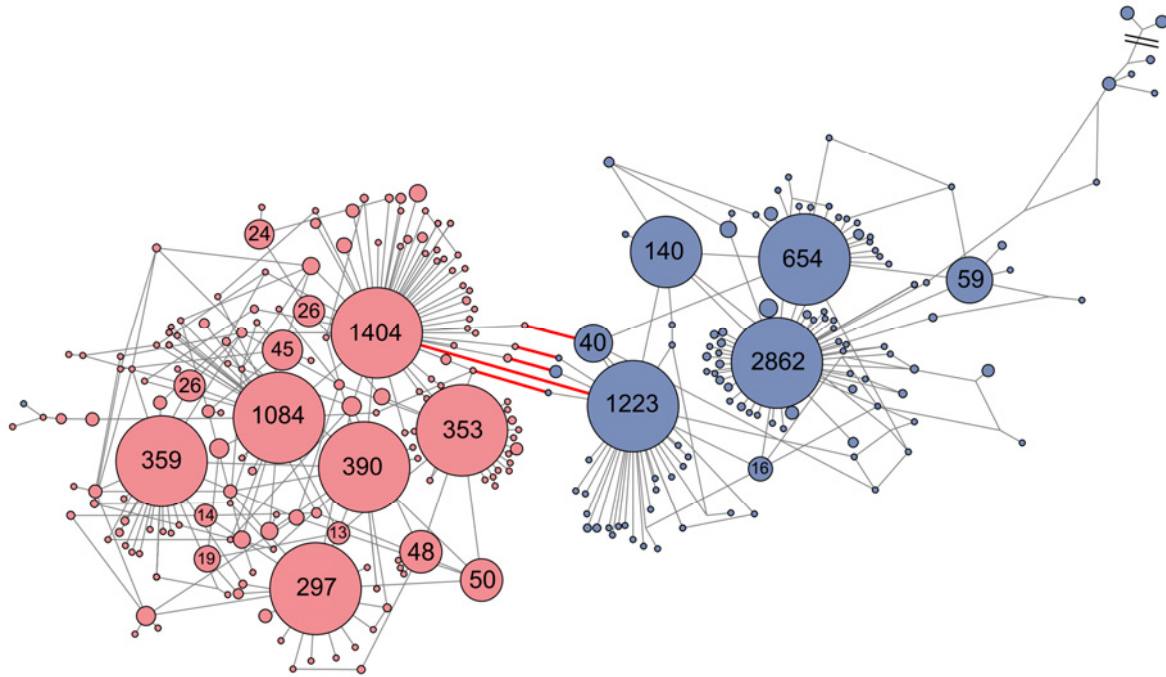
pregnancy. She had a spontaneous vaginal delivery at 39 weeks of pregnancy. Child TV386 was a baby boy and weighed 3.185 kg at birth with APGAR scores of 10-10-10. There were no macroscopic or histological signs of placental pathology. Despite combination antiretroviral therapy, HIV-1 viral load in the mother was 2,400 RNA copies per ml of plasma 13 days before delivery in a context of drug abuse and adherence issues. She received intravenous zidovudine during labor to prevent HIV mother-to-child transmission. The infant had to be weaned of morphine at birth and was administered antiretroviral prophylaxis (zidovudine and lamivudine) for 6 weeks starting in the first 8-12 hours of life. He remained chronically infected with HCV (PCR positive) at age 14.

**Table S1: Genotype-specific and control primers.**

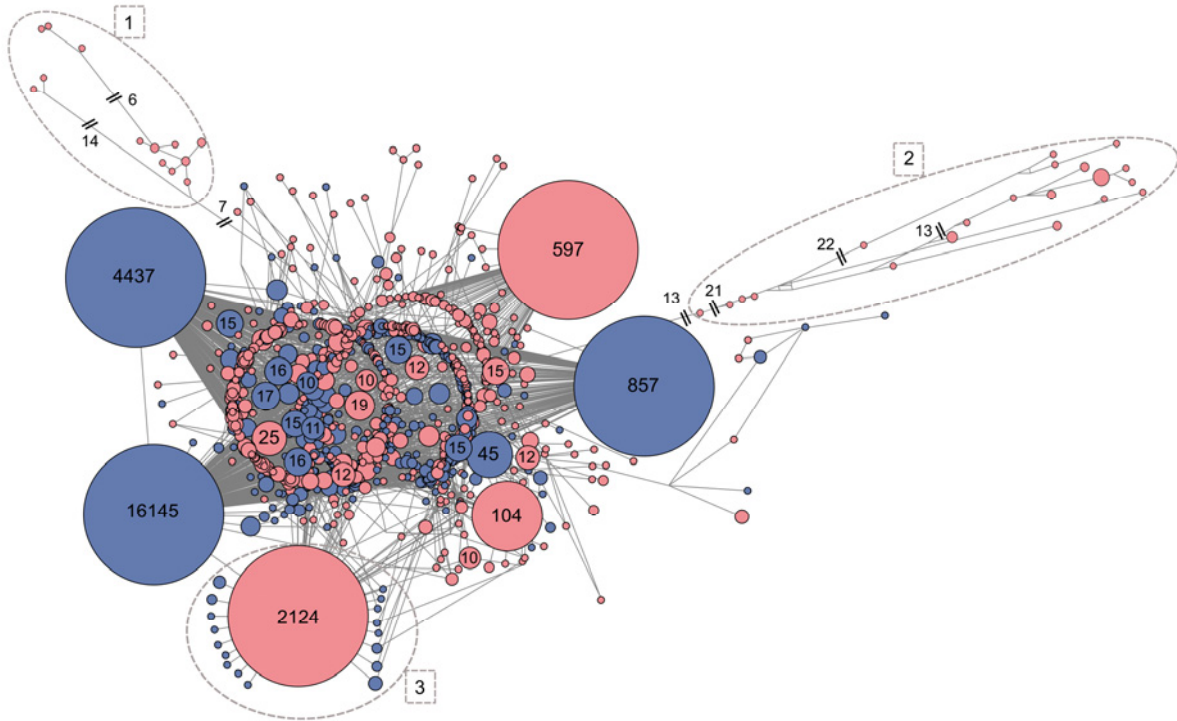
HCV genotype	Primer name	Outer/inner	Polarity	Sequence (5'-3')	Position*	Amplicon size (nt)
HCV-1a	Fext-1a	Outer	Sense	GGCATGGGATATGATGATG	1295-1313	1269
	Rext-1a	Outer	Antisense	ATGAGTARCATCATCCA	2547-2563	
	Fspec-1a	Inner	Sense	TCCATGGTGGGGAACCTGGGCGAA	1428-1450	578
	Rev-1a	Inner	Antisense	ATCCAGGTGCAACCGAACCAATTGCC	1980-2005	
HCV-1b	Fext-1b2	Outer	Sense	ATGGCTTGGGAYATGAT	1293-1309	1123
	Rext-1b2	Outer	Antisense	GRTGGATYAARCCRGTTGGA	2397-2415	
	For-1b	Inner	Sense	GCGGGCCTTGCCTACTATTCCATGG	1410-1434	623
	Rev-1b	Inner	Antisense	CACGTCTGGTGAACCCAGTGC	2011-2032	
HCV-4a	Fext-4a	Outer	Sense	TGATGAACTGGAGTCCAAC	1309-1327	1138
	Rext-4a	Outer	Antisense	AGGTACTGGACGTCCACG	2429-2446	
	For-4a	Inner	Sense	GCYAATTGGGCCAAAGTCATC	1437-1457	679
	Rev-4a	Inner	Antisense	GTCTCCGGATGCTTCCTGAA	2097-2116	
Sanger (1a)	NS1a	na	Sense	ATAACGGGTCACCGCATGGCATGGCATGG GATAT	1278-1312	
	NS1b	na	Antisense	CACCACCACGGGGCTGGGAGTGAAGCAAT	1861-1889	612
	ER2Stu	na	Antisense	CCAGCGGAGGCCTGGTGTGTTAAGG	1955-1980	706
	E2814-842	na	Antisense	GGGCTGAGCTCGGACCTGTCCCTGTCTTC	2304-2332	1055

Barcoding, read signals, and adaptor sequences were engineered at the 5' end of the sense primers as per the manufacturer's instructions. \*Numbering of the nucleotide position is according to that of the H77 HCV-1a isolate (GenBank accession number NC\_004102.1).



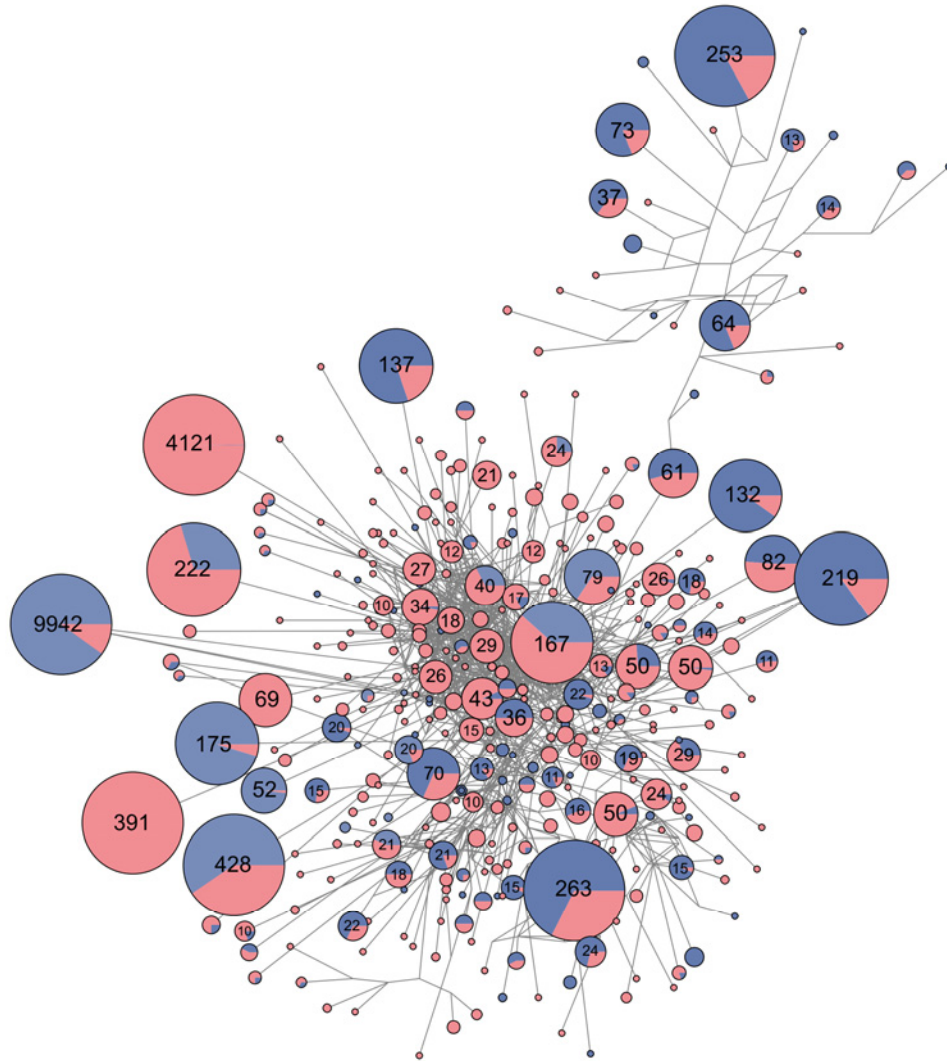


**SUPPLEMENTAL FIG 1. Median joining network analysis of HCV sequences from the TVC31-TVC32 mother-child pair.** MJN was constructed as described under Materials & Methods based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene using all 301 unique variants. Numbers on each node represent the frequency of each variant (only nodes populated with > 10 sequences were displayed for clarity). Mother and child variants are represented in blue and pink, respectively. The link to outlier clusters was not drawn to scale (double bar). Links highlighted in red represent the remaining interconnectivity between the HCV quasispecies in the mother and the child.

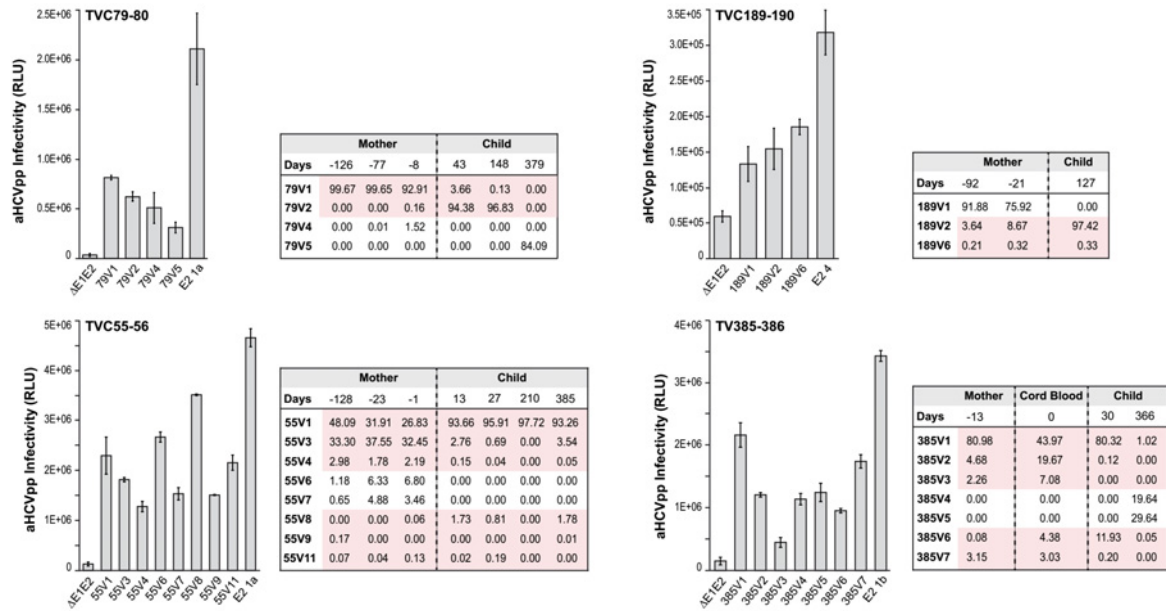


**SUPPLEMENTAL FIG 2. Median joining network analysis of HCV sequences from the TVC79-TVC80 mother-child pair.** MJN was constructed as described under Materials & Methods based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene using all 990 unique variants. Numbers on each node represent the total number of sequences in each cluster (only nodes > 10 were indicated for clarity). Mother and child variants are represented in blue and pink, respectively. Links to outlier clusters were not drawn to scale (double bars), and the number besides the links represent the number of nucleotide substitutions separating outlier groups from the main population clusters. Radiating nodes in groups 1 and 2 (grey dashed circles) could represent the result of directional sequence evolution (see text). Nodes in group 3 (grey dashed circle) are those thought to be potentially involved in a child-to-mother HCV transmission event (see text).

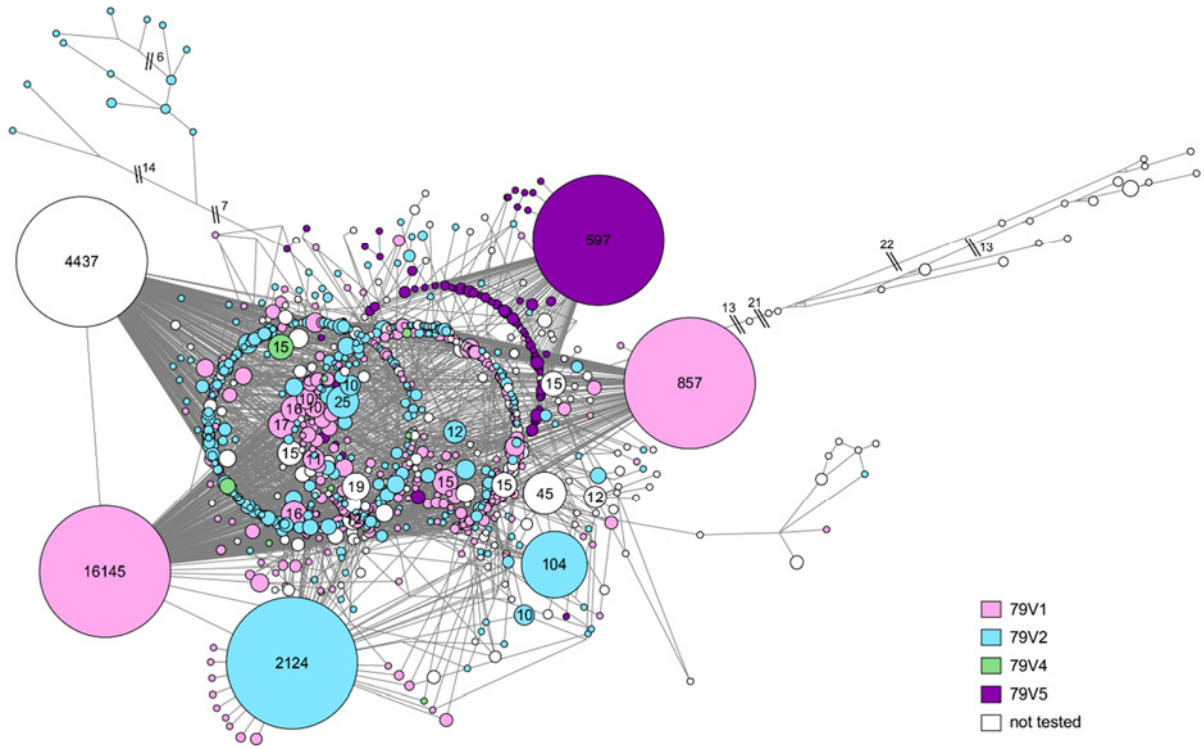




**SUPPLEMENTAL FIG 4. Median joining network analysis of HCV sequences from the TV385-TV386 mother-child pair.** MJN was constructed as described under Materials & Methods based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene. The 2958 unique variants were regrouped into 345 clusters (identity > 98.6%). Numbers on each node represent the total of sequences in each cluster (only nodes > 10 were indicated for simplicity). Pie charts represent the proportion of mother (blue) and child sequences (pink) in each cluster.

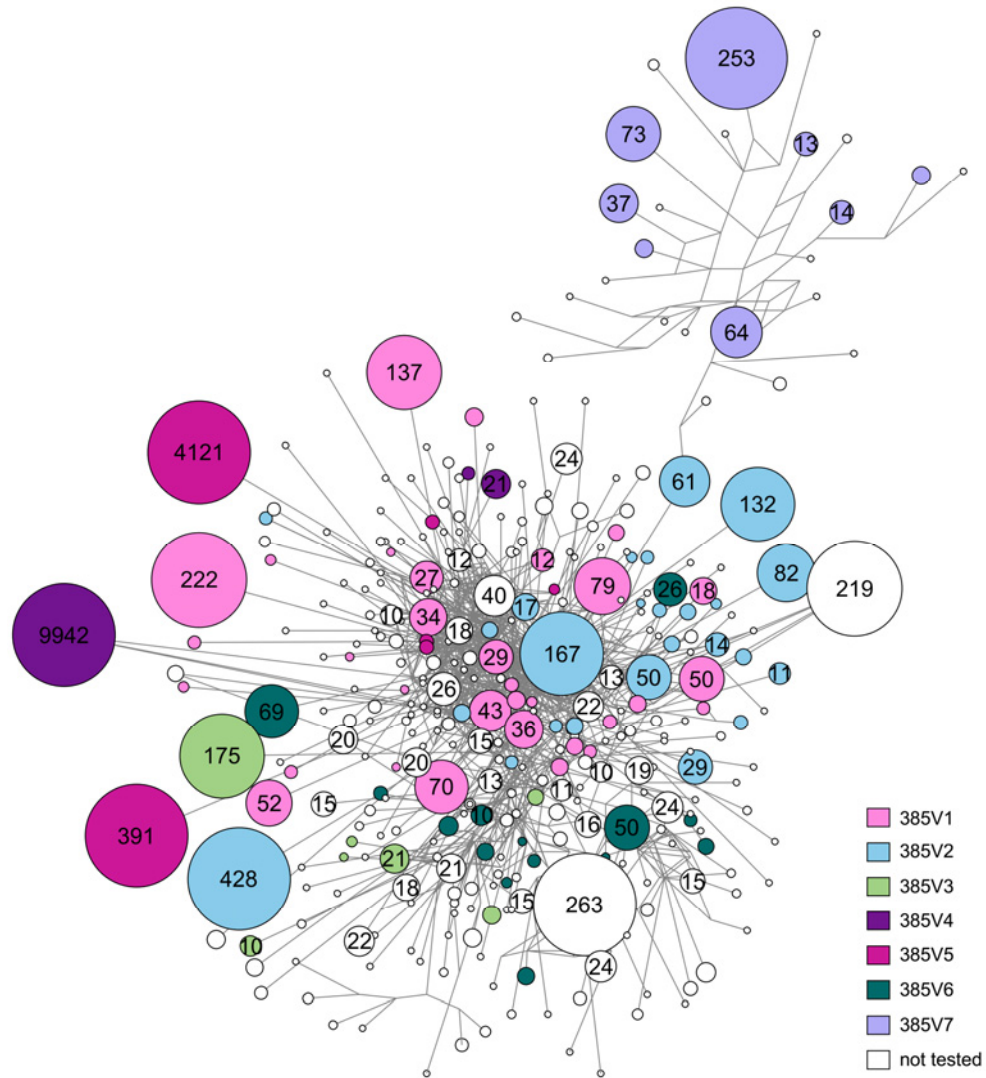


**SUPPLEMENTAL FIG 5. Infectivity of autologous HCV pseudoparticles.** aHCVpp were generated as described under Materials & Methods using sequences derived from major variants and minor variants that were transmitted or not from mother to child. Frequencies based on amino-acid sequences of HCV variants at each time point are shown. Infectivity was estimated using luminescence detection following incubation of aHCVpp preparations with Huh7.5 cell cultures and expressed as relative light units (RLU). HCVpp produced using constructs encoding native HCV-1a, HCV-1b and HCV-4 envelope proteins (E2 1a, E2 1b, E2 4) or an envelope-deleted construct ( $\Delta$ E1E2) were used as controls. Error bars represent the standard error of the mean of triplicate tests from one representative experiment.



**SUPPLEMENTAL FIG 6. Positioning of HCV sequence variants used to generate autologous HCV pseudoparticles in median joining network analysis of HCV sequences from the TVC79-TVC80 mother-child pair.** MJN was constructed as described under Materials & Methods based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene. The 4731 unique variants were regrouped into 316 clusters (nucleotide identity > 98%). Numbers on each node represent the total number of sequences in each cluster (only nodes populated with > 10 sequences were displayed for clarity). Nodes corresponding to HCV variant sequences 79V1-79V7 are highlighted.





**SUPPLEMENTAL FIG 7. Positioning of HCV sequence variants used to generate autologous HCV pseudoparticles in median joining network analysis of HCV sequences from the TV385-TV386 mother-child pair.** MJN was constructed as described under Materials & Methods based on nucleic acid sequences of the N-terminal portion of the HCV E2 envelope gene. The 2958 unique variants were regrouped into 345 clusters (identity > 98.6%). Numbers on each node represent the total of sequences in each cluster (only nodes > 10 were indicated for clarity). Nodes corresponding to HCV variant sequences 385V1-385V7 are highlighted.

### **3.3 Étude d'un cas particulier de transmission verticale du VHC.**

**Article 3: Seronegative Hepatitis C Virus Infection in a Child Infected via Mother-to-Child Transmission. (Journal of Clinical Microbiology 2012, 50, 2515-2519)**

#### **Contribution des auteurs :**

AL : A effectué l'amplification et le séquençage des échantillons ainsi que l'analyse des données de séquençage. Rédaction de l'article.

GG : A participé à l'amplification et au séquençage des échantillons.

NE : A effectué les tests ELISpot.

MQV : A initié le projet et participé au séquençage.

SRM : Est un gastroentérologue pédiatrique qui a participé au suivi et à la prise en charge de la patiente qui est le sujet à l'étude.

FA : A participé au suivi et à la prise en charge de la patiente qui est le sujet à l'étude et a participé à la rédaction du manuscrit.

NHS : A effectué les essais ELISpot et écrit le manuscrit.

HS : Conception et supervision du projet. Rédaction de l'article.



## **Seronegative Hepatitis C Virus Infection in a Child Infected via Mother-to-Child Transmission.**

**Authors :** Ariane Larouche,<sup>a,b</sup> Geneviève Gaëtan,<sup>a,b</sup> Nabil El-Bilali,<sup>b,c</sup> Mathieu Quesnel-Vallières,<sup>a,b</sup> Steven R. Martin,<sup>d,e\*</sup> Fernando Alvarez,<sup>d,e</sup> Naglaa H. Shoukry,<sup>c,f</sup> and Hugo Soudeyns<sup>a,b,e</sup>

**Affiliations :** Unité d'Immunopathologie Virale, Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada<sup>a</sup>; Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada<sup>b</sup>; Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital St.-Luc, Montreal, Canada<sup>c</sup>; Division of Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada<sup>d</sup>; Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada<sup>e</sup>; and Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada<sup>f</sup>

\*Present address: Steven R. Martin, Division of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, Alberta Children's Hospital, Calgary, Alberta, Canada.

Address correspondence to Hugo Soudeyns, [hugo.soudeyns@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:hugo.soudeyns@recherche-ste-justine.qc.ca).

**Hepatitis C virus (HCV) infection typically leads to antibody response within weeks after primary infection. Here, we describe the case of a child infected with HCV by mother-to-child transmission who remained persistently seronegative despite the presence of high levels of circulating HCV RNA.**

### **CASE REPORT**

The female subject of this case report was born in 1999 by cesarean section to a woman infected with hepatitis C virus (HCV) genotype 1a. There was no evidence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in the child or the mother, a former injection drug user who stopped using drugs in 1998 (Table1).The subject was diagnosed

with hepatitis C following two positive HCV RNA PCR tests (Cobas Amplicor HCV, version 2.0; Roche Diagnostics, Montreal, Quebec, Canada) at 10 and 12 months of age. The subject also tested positive for HCV RNA at 1.47, 2.04, 2.58, 3.59, 4.61, 5.49, 6.24, 7.04, 8.06, 9.25, 10.3, and 11.5 years of age using the same technique. In sharp contrast, testing for anti-HCV antibodies using anti-HCV microparticle enzyme immunoassay (MEIA) (AxSYM HCV, version 3.0; Abbott Laboratories, Saint-Laurent, Quebec, Canada) was repeatedly negative (tested 10 times between 1.47 and 10.3 years of age). At age 11.1 years, testing using EIA-1/EIA-2 (Monolisa anti-HCV plus [Bio-Rad Laboratories, Hercules, FL] and HCV ELISA [enzyme-linked immunosorbent assay] test system, version 3.0 [Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ]) yielded indeterminate results. However, samples from the same time point tested negative using the INNO-LIA HCV score assay (Innogenetics, Ghent, Belgium). Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were regularly monitored between the ages of 12 months and 11 years, and HCV plasma RNA levels were quantified in 3 separate instances over this time period using the COBAS Amplicor HCV monitor assay, version 2.0 (Roche Diagnostics) (Fig. 1). At age 9.42 years, persistently elevated (2 times normal) ALT and AST levels justified the introduction of combination treatment with PEGylated interferon alpha-2b (50 g per week) and ribavirin (600 mg per day) (Pegatron; ScheringPlough, Kenilworth, NJ). The HCV plasma viral load was 997,000 IU per ml, 576,000 IU per ml, and 76,000 IU per ml at age 5.20 years, 9.28 years, and 9.64 years, respectively. Treatment was stopped after 30 weeks at age 10.0 years in the absence of sustained virological response. Liver histology scored according to Metavir before the beginning of treatment showed stage 1 fibrosis and absence of inflammation.

Six serum samples obtained from the subject at ages 1.53 years, 3.61 years, 9.25 years, 9.42 years (initiation of treatment), 9.91 years, and 10.3 years (T1 to T6) and one sample obtained from her mother when the subject was 9.91 years of age (M) were used for analysis of quasispecies evolution based on the sequence of the first hypervariable region of the HCV E2 envelope protein (HVR1), which is subjected to selective pressures exerted by the host's humoral and cellular immune responses. The evolution of the variant spectrum or viral quasispecies profile based on this particular region of the HCV genome was associated with the spontaneous clearance of HCV infection and the transition from acute to chronic hepatitis C (11), with the response to interferon treatment (13), with the extent of liver injury (19), and

with the onset of immune responses in children infected by mother-to-child transmission (22). Briefly, HCV RNA was extracted from serum using a QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and then reverse transcribed and amplified based on previously published protocols (4, 11, 13, 28). The PCR products were visualized on 1.7% agarose gels, purified using an agarose gel extraction kit (Feldan-bio, Quebec, Quebec, Canada), and cloned in pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). A total of 261 independent recombinants (17 to 50 recombinants per time point) were randomly selected and sequenced unidirectionally using an ABI 3730xl automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, Quebec, Canada. Sequences were visualized and edited using Chromas, version 1.45 (Technelysium, Southport, Australia), and were aligned using ClustalX, version 1.81 (34) (GenBank accession numbers [JQ808144](#) to [JQ808404](#)). Based on nucleic acid sequences, the quasispecies profile revealed a main variant (variant M1A) representing 88.9% of the total number of clones isolated from the subject at the first time point (1.53 years of age) (Fig. 2A). This variant was identified in the subject at 3.61, 9.42, and 9.91 years of age, indicative of long-term longitudinal persistence. In addition, variant M1A was also found in the mother, in whom it represented 34.0% of the sequences obtained (Fig. 2A). This suggests that this particular viral variant was transmitted from the mother to the child during pregnancy or childbirth. Four additional maternal variants (M2A, M3A, M13A, and M17A) were also found in the child. M2A was found at 3.61 (4.88%) and 9.42 years (10.0%), M3A (4%) and M17A (2%) were found at 9.42 years (4.00% and 2.00%, respectively), and M13A was found at 9.91 years (2.38%), also suggestive of vertical transmission (Fig. 2A). In contrast, neither of two other minor variants found in the child at 1.5 years of age (T14, 5.56%, and T17, 5.56%) nor any other variant subsequently identified in the child were observed in the mother. Examination of the quasispecies profile based on amino acid sequences revealed extensive longitudinal conservation and persistence of the HVR1 peptide, with 82.4% representation at all time points in the child and 83.0% representation in the mother (i.e., the large majority of mutations were synonymous nucleotide substitutions) (Fig. 2B). To examine the evolution of viral sequences during the follow-up period, phylogenies based on Kimura 2-parameter distance matrices and the neighbor-joining method were constructed using MEGA4 (33). The resulting tree exhibits low bootstrap values and extensive cross-grouping of variants isolated from different time

points, indicative of a lack of directional divergence of nucleotide sequences (Fig. 2C). Sequences originating from the mother (M) did not cluster separately from sequences derived from the subject. Finally, the mean frequencies of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site ( $dN$ ) and of synonymous substitutions per synonymous site ( $dS$ ) and the  $dN/dS$  ratio were computed based on HVR1 sequences according to the Nei-Gojobori method with the Jukes-Cantor correction (26). The resulting value of  $dN/dS$  (0.22) was compatible with nondirectional genetic drift and an absence of selective pressure on HVR1, even during interferon treatment. Taken together, these results are consistent with impairment or absence of host immune responses directed against HCV.

No apparent abnormalities in IgG profiles were noted in this particular subject, and the presence of antibody responses against childhood vaccinations (hepatitis A virus [HAV], hepatitis B virus [HBV], tetanus, mumps, and rubella) was confirmed (data not shown). To characterize HCV-specific cell-mediated immune responses, enzyme-linked immunospot assay (ELISpot) was performed using the subject's peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained at age 10.3 years and pools of overlapping peptides representing the core protein, NS3, and NS5B of HCV-1a (H77; BEI Resources, American Type Culture Collection, Manassas VA), as previously described (8). Purified recombinant core protein and NS3 (Feldan Bio) were also used as antigens. The CEF (cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and influenza virus) peptide pool (NIH AIDS Research and Reference Reagents Program) and phorbol myristate acetate (PMA)-ionomycin were used as positive controls. Spots were counted using an S4 immunospot analyzer (CTL Technologies Ltd., Shaker Heights, OH), and data were expressed as spot-forming units (SFU) per  $10^6$  PBMC. The subject responded very well to stimulation by PMA-ionomycin but only exhibited comparatively modest responses, below the generally accepted threshold of positivity (50 SFU per  $10^6$  PBMC). These responses were directed against NS3 pool 5 (5 SFU per  $10^6$  PBMC), NS3 pool 6 (5 SFU per  $10^6$  PBMC), NS5B pool 10 (5 SFU per  $10^6$  PBMC), purified core protein (5 SFU per  $10^6$  PBMC), and purified NS3 protein (10 SFU per  $10^6$  PBMC) (data not shown).

The presence of multiple risk factors for HCV infection and elevated HCV viral load in the mother have been associated with mother-to-child transmission in a number of studies (5, 25) but not in others (7; reviewed in reference 20). In addition, elective caesarean section was not shown to be effective to prevent vertical HCV transmission (10). In infants with

chronic hepatitis C, HVR1 variability increases with the development of immunity, consistent with mounting selective pressures being exerted on HCV gene products by host humoral and cell-mediated immune responses (12, 22). In the case reported herein, no HCV-specific antibody responses were detected, and comparatively few cells producing gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) in response to HCV antigens were found in peripheral blood. These observations are compatible with reduced selective pressure on HVR1 and with variations in HVR1 sequences being largely limited to synonymous substitutions caused by the high error rate of the viral RNA-dependent RNA polymerase. Seronegative HCV infection in immunocompetent subjects has been reported previously, usually in the context of early reports where viral population analysis was not performed (9, 21, 31, 32). However, to our knowledge, it was never observed in the context of mother-to-child transmission. In contrast, seronegative HCV infection was reported in patients with X-linked agammaglobulinemia (XLA) or common variable immunodeficiency (CVID) (16), two diseases that have a strong impact on humoral immunity. Viral variants isolated from XLA patients showed low variability in HVR1 (1 or 2 amino acid residues of the 27 amino acid residues that comprise HVR1), similar to the subject examined in the present study (i.e., the variant spectrum remains relatively similar between time points spread out over a long period of time). However, variants isolated from CVID patients typically present with comparatively more amino acid substitutions (i.e., 10) (16). Seronegative HCV infection and stable variantspectrum were also observed in subjects with hepatitis C who are coinfecting with HIV-1, a T-lymphotropic virus that is well known to interfere with the initiation and maintenance of humoral and cell-mediated immune responses (3, 4, 6, 17, 24, 28). George et al. (17) reported that CD4 T cell counts were higher in HCV- and HIV-coinfecting subjects who were HCV seropositive than in coinfecting subjects who were HCV seronegative despite detectable HCV RNA levels, suggestive of a relationship between the absence of HCV-specific antibody production and HIV-associated impairment of cell-mediated immunity.

HCV quasispeciation profiles are strongly influenced by HIV-1 infection (23, 29). In the presence of low CD4 T cell counts and/or suboptimal antiretroviral therapy (ART), the HCV variant spectrum becomes homogenous as a result of reduced immune selective pressure exerted on HCV antigens. Conversely, when HIV-1 replication is suppressed by ART, the variant spectrum rapidly evolves and diversifies (4, 28). In the present case, CVID,

HIV infection, and XLA (subject is female) were all excluded as possible causes of persistent HCV seronegativity and absence of selective pressure. Regardless, these diseases are associated with defective immune responses against entire groups of pathogens and not specific ones, such as what seems to be observed in this case. Also, subjects who suffer from XLA do not usually exhibit major defects in T cell-mediated immune responses (14). Alternative explanations could include (i) unique biological properties of the HCV strain infecting this particular subject, leading to an unusually efficient viral avoidance of host immune responses, (ii) impairment of the generation of antibody responses by HCV via direct infection of T cell and/or B cell subsets (1, 2, 15, 30), and (iii) the presence in the child of a putative genetic polymorphism or defect that would affect humoral immune responses directed against HCV in particular. Finally, since the subject could have been infected *in utero*, this could represent a possible case of neonatal immune tolerance specific to HCV leading to the absence of significant generation of long-term humoral and cell-mediated immune responses as a result of T cell and B cell anergy and/or clonal deletion. Immune tolerance to HCV was recently hypothesized as a possible cause for low HVR1 diversity in immunocompetent children who were infected with HCV during the perinatal period (18). This situation might be analogous to that observed in hepatitis B virus infection, where mother-to-child transmission leads to neonatal tolerance, long-term seronegativity, and chronic viral persistence (27).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to H.S. (grant HOP-98831) and N.H.S. (grant MOP106468) and by an infrastructure grant from le Réseau SIDA et Maladies Infectieuses of le Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS). M.Q.-V. was the recipient of the Gabriel-Marquis Scholarship, Université de Montréal, and was supported by la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, FRQS, and CIHR. N.H.S. is the recipient of a Chercheur Boursier (Junior-2) salary award from FRQS.

## REFERENCES

1. **Azzari C, et al.** 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**:65–71.
2. **Azzari C, et al.** 2000. Vertical transmission of HCV is related to maternal peripheral blood mononuclear cell infection. *Blood* **96**:2045–2048.
3. **Bharti AR, et al.** 2011. Clinical variables identify seronegative HCV coinfection in HIV-infected individuals. *J. Clin. Virol.* **52**:328–332.
4. **Canobio S, et al.** 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.
5. **Ceci O, et al.** 2001. Vertical transmission of hepatitis C virus in a cohort of 2,447 HIV-seronegative pregnant women: a 24-month prospective study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **33**:570–575.
6. **Chamie G, et al.** 2007. Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* **44**:577–583.
7. **Conte D, Fraquelli M, Prati D, Colucci A, Minola E.** 2000. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology* **31**:751–755.
8. **Drouin C, Lamarche S, Bruneau J, Soudeyns H, Shoukry NH.** 2010. Cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus (HCV) alternate reading frame protein (ARFP) are undetectable during acute infection. *J. Clin. Virol.* **47**:102–103.
9. **Durand F, Beauplet A, Marcellin P.** 2000. Evidence of hepatitis C virus viremia without detectable antibody to hepatitis C virus in a blood donor. *Ann. Intern. Med.* **133**:74–75.
10. **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.
11. **Farci P, et al.** 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of viral quasispecies. *Science* **288**:339–344.
12. **Farci P, et al.** 2006. Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:8475–8480.
13. **Farci P, et al.** 2002. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:3081–3086.
14. **Fried AJ, Bonilla FA.** 2009. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**: 396–414.
15. **Gabrielli A, et al.** 1994. Active hepatitis C virus infection in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells from patients with mixed cryoglobulinaemia. *Clin. Exp. Immunol.* **97**:87–93.
16. **Gaud U, Langer B, Petropoulou T, Thomas HC, Karayiannis P.** 2003. Changes in hypervariable region 1 of the envelope 2 glycoprotein of hepatitis C virus in children and adults with humoral immune defects. *J. Med. Virol.* **69**:350–356.
17. **George SL, et al.** 2002. Hepatitis C virus viremia in HIV-infected individuals with negative HCV antibody tests. *J. Acquir. Immune Def. Syndr.* **31**:154–162.

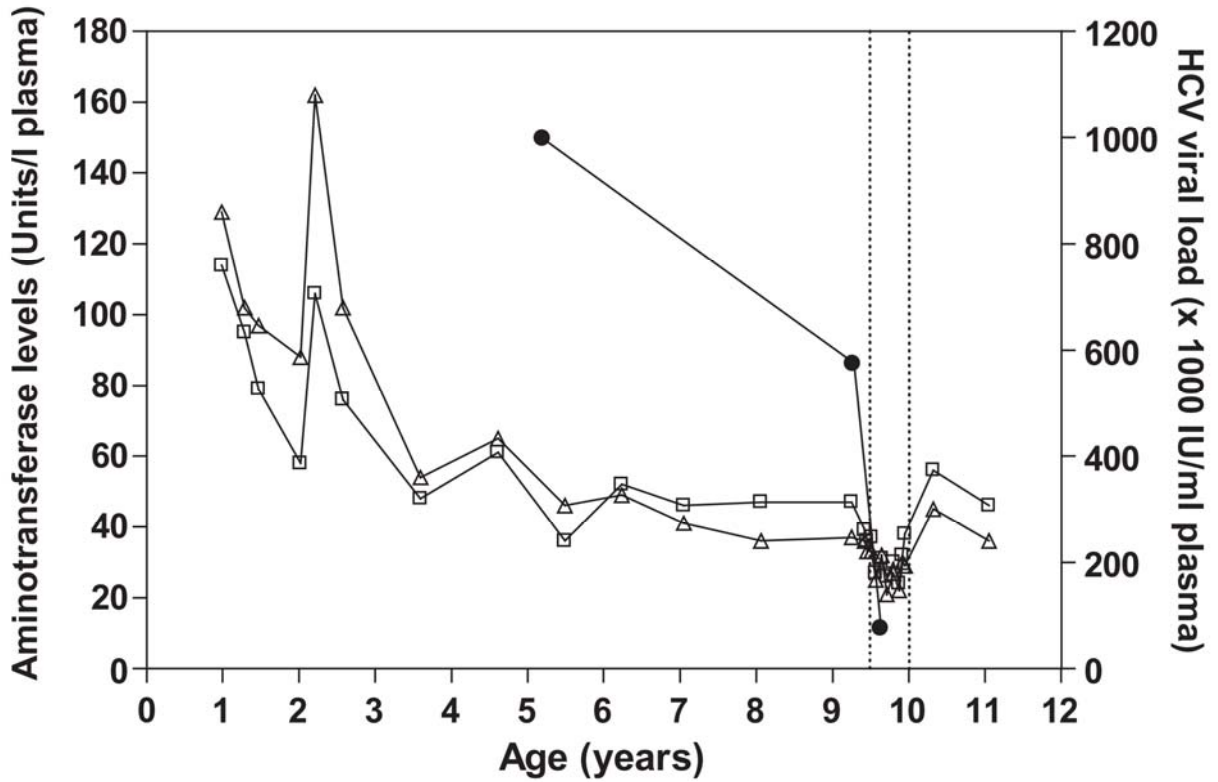
18. **Gismondi MI, et al.** 2009. Evolution of hepatitis C virus hypervariable region in immunocompetent children born to HCV-infected mothers. *J. Viral Hepat.* **16**:332–339.
19. **Honda M, et al.** 1994. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* **20**:1144–1151.
20. **Indolfi G, Resti M.** 2009. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J. Med. Virol.* **81**:836–843.
21. **Luengrojanakul P, et al.** 1994. Hepatitis C virus infection in patients with chronic liver disease or chronic renal failure and blood donors in Thailand. *J. Med. Virol.* **44**:287–292.
22. **Manzin A, et al.** 2000. Dominant role of host selective pressure in driving hepatitis C virus evolution in perinatal infection. *J. Virol.* **74**: 4327–4334.
23. **Mao Q, et al.** 2001. Human immunodeficiency virus seroconversion and evolution of hepatitis C virus quasispecies. *J. Virol.* **75**:3259–3267.
24. **Mazza C, et al.** 1998. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus (HCV) infection. Study Group for Vertical Transmission. *J. Med. Virol.* **54**:12–19.
25. **Murakami J, et al.** 12 January 2012. Risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus: maternal high viral load and fetal exposure in the birth canal. *Hepatol. Res.* [Epub ahead of print]. doi:10.1111/j.1872-034X.2012.00968.x.
26. **Nei M, Gojobori T.** 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**:418–426.
27. **Ni YH.** 2011. Natural history of hepatitis B virus infection: pediatric perspective. *J. Gastroenterol.* **46**:1–8.
28. **Quesnel-Vallièrès M, Lemay M, Lapointe N, Martin SR, Soudeyans 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.
29. **Roque-Afonso AM, et al.** 2002. Influence of CD4 cell counts on the genetic heterogeneity of hepatitis C virus in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* **185**:728–733.
30. **Sarhan MA, Pham TN, Chen AY, Michalak TI.** 2012. Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. *J. Virol.* [Epub ahead of print.]
31. **Schmidt WN, et al.** 1997. Surreptitious hepatitis C virus (HCV) infection detected in the majority of patients with cryptogenic chronic hepatitis and negative HCV antibody tests. *J. Infect. Dis.* **176**:27–33.
32. **Silini E, et al.** 1993. Virological features of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2913–2917.
33. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar SS.** 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596–1599.
34. **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876–4882.



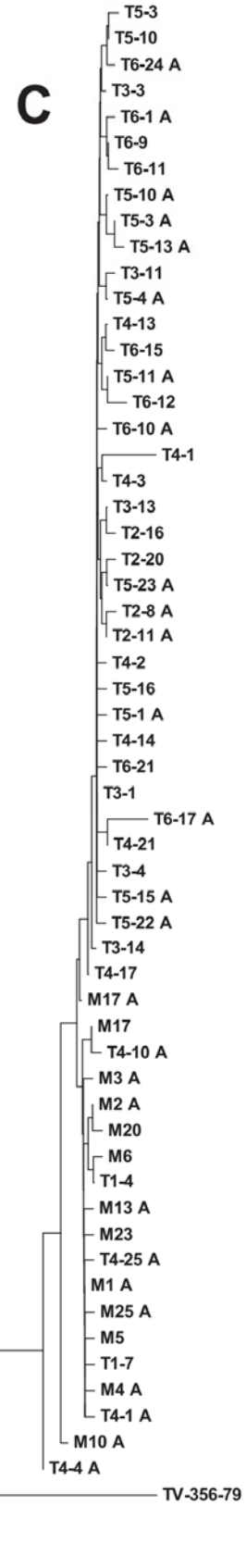
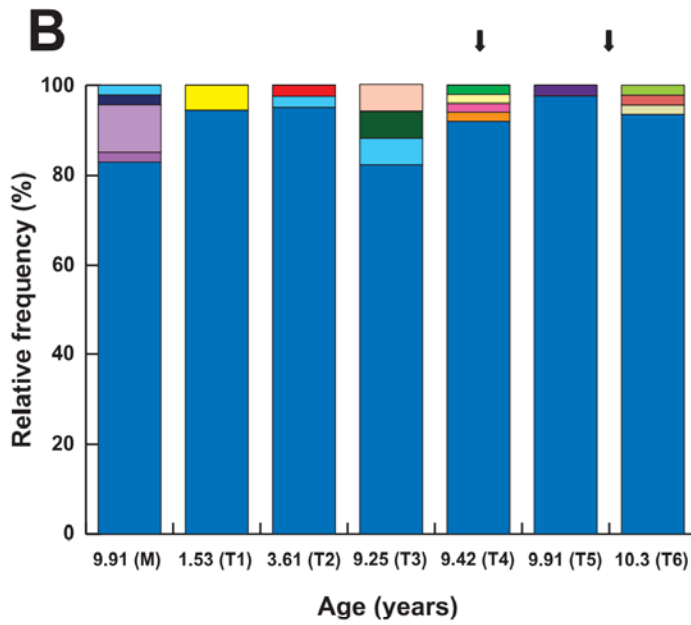
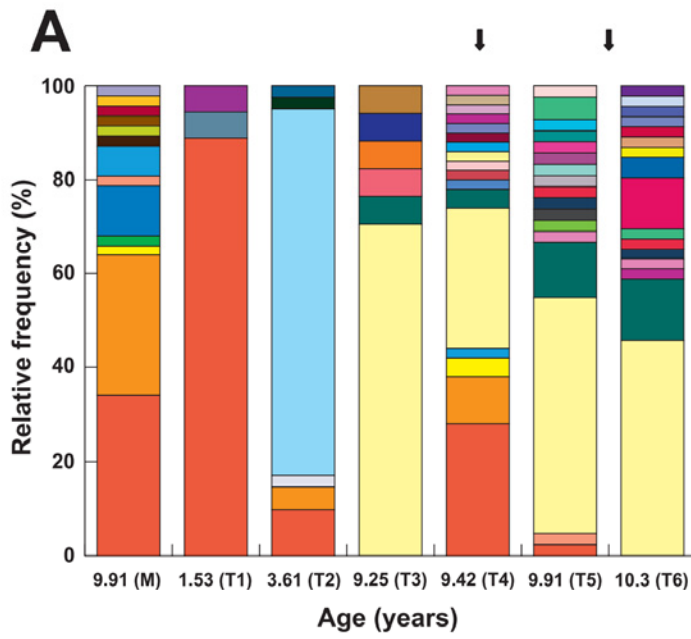
**TABLE 1** Clinical characteristics of study subjects

Characteristic	Manner or value
Possible modes of HCV infection (mother)	Injection drug use, blood transfusion
Gestational age (wk)	35.7
Birth wt (g)	2,560
Mode of delivery	Cesarean section <sup>a</sup>
Apgar score (1 min)	5
Apgar score (5 min)	7
Maternal HCV viral load at delivery	Not determined <sup>b</sup>
Maternal HCV viral load in 2010	$1.0 \times 10^7$ UI per ml plasma <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Membrane rupture 24 h; cephalo-pelvic disproportion. <sup>b</sup> HCV RNA positive at delivery using qualitative PCR (Cobas Amplicor HCV, version 2.0). <sup>c</sup> Measured using COBAS Amplicor HCV Monitor assay version 2.0.



**FIG 1** Clinical parameters measured in the study subject. Alanine aminotransferase (ALT; open squares), aspartate aminotransferase (AST; open triangles), and plasma HCV RNA levels (closed circles) were measured as described in the text. Vertical dashed lines indicate the beginning and end of PEGylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment.



**FIG 2** Longitudinal analysis of HCV quasispecies structure in the study subject and her mother. Each color represents an identical HCV HVR1 variant in longitudinal analysis. A total of 261 sequences were analyzed as described in the text. M, mother,  $n = 47$ ; T1, 1.53 years,  $n = 18$ ; T2, 3.61 years,  $n = 41$ ; T3, 9.25 years,  $n = 17$ ; T4, 9.42 years,  $n = 50$ ; T5, 9.91 years,  $n = 42$ ; T6, 10.3 years,  $n = 46$ . (A) Analysis of the variant profile based on HVR1 nucleic acid sequences. (B) Analysis of the variant profile based on HVR1 amino acid sequences. Arrows indicate the beginning and end of PEGylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment. (C) Phylogenetic analysis of HVR1 nucleic acid sequences. The TV-356-79 reference sequence (GenBank accession no. [AY385797](#) [4]) was used as the outgroup.

## 4. Discussion générale

Le développement de stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des femmes enceintes infectées par le VHC reste un enjeu mondial important. En effet, bien que des médicaments anti-VHC à haute efficacité aient été mis sur le marché ces dernières années, ils ne sont pas accessibles partout dans le monde (136). Certains pays manquent tout simplement de ressources financières pour pouvoir s'offrir ces traitements dont les coûts sont présentement exorbitants. Également, le dépistage de l'infection à VHC chez la femme enceinte, ou désirant le devenir, n'est pas systématique, empêchant ainsi un traitement préconception dans la majorité des cas. Finalement, il n'y a pas encore eu de tests d'innocuité de ces médicaments chez la femme enceinte et de tels essais sont éthiquement difficiles à réaliser. Au final, la prévention de la transmission mère-enfant du VHC reste inachevable pour l'instant, et bien que la FDA ait récemment approuvé l'usage du sofosbuvir et d'une combinaison de sofosbuvir et de ledipasvir chez les enfants âgés de 12 ans et plus (219), on ne connaît pas les conséquences à long terme qu'une infection chronique par le VHC pendant 12 ans pourrait avoir eu sur la vie de ces enfants. De plus, l'accès à ces traitements chez les enfants est aussi restreint pour des raisons de coût et de dépistage. L'éradication mondiale du VHC est donc loin d'être accomplie.

C'est dans cette optique que nous avons entrepris cette étude de l'infection à VHC chez la femme enceinte et l'enfant, et des déterminants impliqués dans la TV du VHC. Notre hypothèse de départ était que la réponse humorale maternelle aurait une influence sur la composition et l'évolution de la quasiespèce du VHC pendant la grossesse et sur l'incidence de la TV du VHC. Nous suspicions aussi que ces mécanismes pourraient différer chez les mères coinfectées par le VHC et le VIH-1.

Dans une cohorte de 42 femmes enceintes infectées par le VHC seulement (n=19) ou coinfectées par le VHC et le VIH-1 (n=23), ainsi que chez 5 couples mères-enfants où il y a eu TV, nous avons été capable de caractériser la composition de la quasiespèce du VHC et d'évaluer la réponse humorale neutralisante spécifique au VHC. Afin de caractériser plus en profondeur le goulot d'étranglement dans la TV du VHC, le nombre de variantes transmises de la mère à l'enfant fut déterminé, le moment où la transmission s'est produite a été estimé et la structure des réseaux phylogénétiques des variantes a été analysé. Suite à ces analyses,

nous sommes parvenus à tirer plusieurs conclusions originales en ce qui a trait à la manière dont l'immunité humorale maternelle influençait la pathogenèse du VHC pendant la grossesse et la transmission du VHC de la mère à l'enfant, ainsi que les différences présentes lorsque la mère est coïnfectée par le VHC et le VIH-1 :

- 1. La diversité et l'évolution de la quasiespèce du VHC sont associées aux pressions de sélection exercées par la réponse neutralisante autant chez la mère que chez l'enfant, indépendamment du statut de coïnfection de la mère.**
- 2. La présence d'une réponse neutralisante suffisamment efficace pour entraîner la diversification de la quasiespèce du VHC pendant la grossesse est un facteur protectif contre la TV du VHC chez les patientes infectées par le VHC seulement mais pas chez les femmes coïnfectées.**
- 3. Le goulot d'étranglement lors de la TV du VHC est passablement étroit lorsque la mère n'est infectée que par le VHC, mais s'élargit en cas de coïnfection maternelle par le VIH-1.**
- 4. Le passage du VHC de la mère à l'enfant peut s'effectuer beaucoup plus tôt qu'on le croyait, soit possiblement aussi précocément qu'au début du 2<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse.**
- 5. Bien que les résultats de ces études ne nous permettent pas d'identifier avec certitude les mécanismes précis impliqués dans la TV du VHC, ils suggèrent fortement que ces mécanismes sont fondamentalement différents selon que la mère est infectée par le VHC seul ou coïnfectée par le VHC et le VIH-1.**

#### 4.1 Diversité de la quasiespèce et réponse neutralisante

Au sein de notre cohorte de femmes enceintes infectées par le VHC (Article 1), les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence de fortes corrélations entre la diversité de la quasiespèce du VHC, les pressions de sélection exercées sur l'enveloppe virale et l'efficacité de la réponse neutralisante maternelle pendant la grossesse, révélant ainsi que ces trois facteurs sont intimement liés. Ces associations ont été observées autant chez la femme infectée par le VHC seul que chez les patientes coinfectedes par le VHC et le VIH-1. Ainsi, on observe que plus l'activité neutralisante est élevée, plus la pression évolutive est grande et plus le virus doit muter pour échapper au système immunitaire, ce qui entraîne une diversité de quasiespèce plus importante.

On observe une relation très similaire, voire identique, entre la composition de la quasiespèce et la réponse neutralisante chez les enfants infectés verticalement (Article 2). Un changement dans la composition de la quasiespèce à 1 an se produit chez ceux qui développent leur propre réponse neutralisante alors que chez celui qui ne la développe pas, la quasiespèce reste presque invariante. Malgré des différences notables dans la composition des quasiespèces des mères et des enfants et une diversité pouvant être très élevée, l'analyse des réseaux phylogénétiques a révélé une forte interconnectivité entre les variantes des enfants et de leur mère, qui occupent un même espace de séquences. Cela suggère que cet espace de séquence est restreint par une immunité similaire de la mère et de l'enfant. En effet, la présence des anticorps maternels chez l'enfant pendant la première année de vie confère à ce dernier une immunité humorale identique à celle de sa mère, ce qui peut être aussi observé dans les réponses neutralisantes des enfants avant 1 an (Article 2). Suite au développement de sa propre réponse humorale, l'immunité de l'enfant, maintenant distincte de celle de sa mère, peut appliquer une pression sélective différentielle sur la quasiespèce. On voit alors apparaître des groupes de variantes sortant de l'espace de séquence occupé auparavant comme dans le cas de l'enfant TVC80. Dans le cas de la patiente 1 (Article 3), une enfant infectée verticalement n'ayant jamais développé de réponse humorale spécifique au VHC, on a aussi observé la persistance d'une variante majoritaire sur une échelle de plusieurs années et une forte proximité de séquence avec les variantes de la mère.

Nos résultats sont ainsi en accord avec plusieurs études dont les résultats suggéraient que l'évolution d'HVR1 était influencée par la réponse neutralisante de l'hôte, notamment

chez des patients en phase aiguë suivis à long terme (44, 60, 221) ainsi que chez des patients atteints de CVID présentant de faibles niveaux d'immunoglobulines (222, 223) et chez des chimpanzés inoculés avec une souche identique du VHC (224). Chez deux enfants verticalement coïnfectés par le VHC et le VIH-1, l'évolution de la quasiespèce du VHC (aussi basée sur la région HVR1) commence à être observée à 1.25 ans (suivant la disparition des anticorps maternels) mais seulement chez l'enfant immunocompétent (décompte CD4 > 500 cellules par mm<sup>3</sup>), alors que la persistance de variantes sur plusieurs années (>17 ans) est observée chez l'enfant immunosupprimé (225, 226). Une étude menée chez 12 enfants infectés verticalement par le VHC a aussi révélé une absence de changement dans HVR1 avant la séroconversion (227). Suite au développement de la réponse humorale spécifique au VHC, 2 profils d'évolution de la quasiespèce basée sur HVR1 ont été observés par ces chercheurs: chez les enfants présentant des niveaux d'ALT faibles ou normaux, la diversité de la quasiespèce (mesurée dans ce cas par la distance de Hamming) augmentait alors que chez les enfants présentant de hauts niveaux d'inflammation hépatique, la diversité diminuait. Les auteurs suggèrent que les faibles niveaux d'ALT pourraient être le résultat d'une réponse à médiation cellulaire anti-VHC inefficace et d'une dominance relative de la réponse humorale, entraînant ainsi une évolution rapide d'HVR1. À l'inverse, une forte inflammation hépatique dans le deuxième groupe d'enfants suggérerait la présence d'une réponse T cytotoxique significative contrebalancée par une réponse humorale moins efficace et une faible diversité dans HVR1. De façon intéressante, nos travaux ont aussi révélé la présence d'une inflammation hépatique plus importante chez les femmes enceintes mono-infectées qui avaient été stratifiées dans le groupe à faible diversité (Article 1). On pourrait ainsi spéculer que la forte inflammation hépatique observée chez ces patientes témoigne de la présence d'une réponse T cytotoxique importante mais d'une réponse humorale de plus faible magnitude.



## **4.2 Importance de la réponse neutralisante dans la TV du VHC chez les patientes mono-infectées**

Les résultats de l'étude chez la femme enceinte ont aussi révélé qu'une haute diversité de la quasiespèce est un facteur protectif vis-à-vis de la TV du VHC chez les patientes mono-infectées, que cette haute diversité résulte d'une réponse neutralisante efficace, et que les patientes ayant une grande diversité présentent des niveaux d'inflammation hépatique plus faibles. Cela est en accord avec les études mentionnées ci-dessus et suggérant qu'une haute diversité d'HVR1 était associée à une réponse neutralisante efficace et accompagné d'une inflammation hépatique faible (donc d'une réponse cytotoxique possiblement moins dominante). À l'opposé, les patientes présentant une faible diversité de quasiespèce (reflétant une réponse neutralisante faible), auxquelles ont été associé un risque plus élevé de TV du VHC, présentent une inflammation hépatique plus élevée, ce qui suggère une réponse cytotoxique significative. À la lumière de ce raisonnement on pourrait suggérer que la réponse neutralisante semble plus importante que la réponse à médiation cellulaire en ce qui a trait à la prévention de la TV du VHC. Ceci dit, la réponse cytotoxique spécifique au VHC n'a pas pu être évaluée chez nos patientes en raison des quantités de sang trop importantes généralement requises pour mener de tels tests. Cette hypothèse contraste avec la clairance de l'infection, pour laquelle une importance de la réponse cellulaire a été plusieurs fois mise en évidence. Chez des adultes en phase aiguë de l'infection, un pic élevé d'inflammation hépatique est observé entre 5 et 15 semaines suivant l'infection et est accompagné d'une diversité diminuée de la quasiespèce basée sur la région HVR1 chez les patients qui résolvent l'infection, alors que ceux progressant vers une infection chronique ne présentent qu'une modeste élévation d'ALT et une diversité augmentée de la quasiespèce suivant la séroconversion (48). Les mêmes auteurs ont trouvé la même relation entre la clairance de l'infection suite à un traitement par l'IFNA (monothérapie), et l'apparition rapide d'une quasiespèce homogène (228). La présence d'une inflammation hépatique élevée pendant la première année de vie chez des enfants verticalement infectés a été associée à de meilleures chances de clairance spontanée (229). Finalement, les enfants infectés verticalement éliminant spontanément l'infection répondraient à une plus large gamme d'antigènes du VHC et possèderaient une quantité significativement plus grande de cellules sécrétant de l'IFN-gamma (IFNG) en réponse au VHC que les enfants progressant vers une infection chronique

(230). Dans cette même étude, les enfants transitoirement infectés présentaient aussi une réponse à médiation cellulaire significativement plus forte que les enfants exposés non infectés, suggérant ainsi que la réponse cellulaire de l'enfant est plus importante pour la clairance de l'infection que pour prévenir la TV, tel que suggéré par nos données.

Le rôle de la réponse humorale maternelle dans la transmission du VHC de la mère à l'enfant a été très peu étudié. À notre connaissance, une seule étude a évalué l'association entre la TV et la présence d'anticorps neutralisants spécifiques au VHC (231). L'étude a été réalisée sur un groupe de 63 femmes enceintes toutes coinfectedes par le VHC et le VIH-1, parmi lesquelles 16 avaient transmis le VHC à leur enfant. Aucune association entre la présence d'anticorps neutralisants spécifiques au VHC (mesuré par des essais de neutralisation sur une seule VHCpp de génotype 1a (H77)) et la TV du VHC n'avait été décelée (231). En accord avec ces résultats, nous n'avons pas trouvé d'association entre l'efficacité de la réponse neutralisante et la TV du VHC chez les patientes coinfectedes (Article 1). Par contre, chez les patientes mono-infectées, une proportion significativement plus grande de femmes n'ayant pas transmis le VHC à leur enfant (92%) présentaient une capacité de neutralisation de plus de 50% comparé aux patientes ayant transmis le virus (50%). Ajouté à l'association entre haute diversité, protection contre la TV et forte réponse neutralisante, ces résultats suggèrent qu'une réponse neutralisante suffisamment efficace applique une pression immunitaire sur la quasispèce et provoque la disparition de certaines variantes. On détecte alors la prolifération de variantes d'échappement qui, par l'acquisition de mutation favorables à l'évasion immunitaire, subissent en contrepartie une perte de fitness résultant en une diminution du risque de TV du VHC. Puisque la région du génome du VHC étudiée ici est HVR1, on peut considérer l'infectivité relative de chacune des variantes comme représentative du fitness. Chez les patientes qui transmettent le virus, la présence d'une activité neutralisante sous optimale n'exerçant pas une pression sélective suffisante sur l'enveloppe ferait en sorte que les variantes les plus infectieuses ne seraient pas éliminées et seraient détectées à des fréquences relatives plus élevées dans la population virale à cause de leur pouvoir infectieux plus grand que les potentielles variantes d'échappement. L'émergence de ces dernières ne se produirait donc pas ou ne serait pas détectée résultant en une faible diversité de la quasispèce. On peut extrapoler ce principe au couple mère/enfant-séronégative (Article 3): la quasispèce maternelle est très homogène et pratiquement

identique à celle de l'enfant, on pourrait donc supposer que la réponse neutralisante de la mère est inefficace avec pour résultat la transmission à l'enfant de la variante prépondérante. Bien que l'échantillon de la mère utilisé pour caractériser la quasiespèce date de 10 ans après l'accouchement, le fait d'observer la variante transmise à l'enfant, et majoritaire autant chez la mère que l'enfant, suggère fortement que cette même variante devait aussi constituer la majeure partie de la quasiespèce de la mère pendant la grossesse.

Il semble qu'à partir d'un certain seuil de perte d'infectivité les variantes ne soient plus en mesure de passer de la mère à l'enfant, suggérant un mode de TV spécifique au moins de l'attachement du virus à la surface cellulaire ou à d'autres molécules transitant à travers l'IMF. De ce fait, la TV du VHC pourrait se produire 1) via l'infection directe du placenta par le VHC, 2) via l'attachement à des récepteurs impliqués dans le transport de nutriments de la mère au fœtus, 3) via l'attachement à des IgG non neutralisantes qui sont passivement transférées de la mère à l'enfant ou 4) via l'attachement ou l'infection de cellules immunitaires de la mère qui peuvent transiter à travers la barrière placentaire et se retrouver chez l'enfant. Tous ces mécanismes hypothétiques pourraient expliquer pourquoi une perte d'infectivité suite à une diversification d'HVR1 résultant de pressions de sélection exercées par la réponse neutralisante diminuerait le risque de TV.

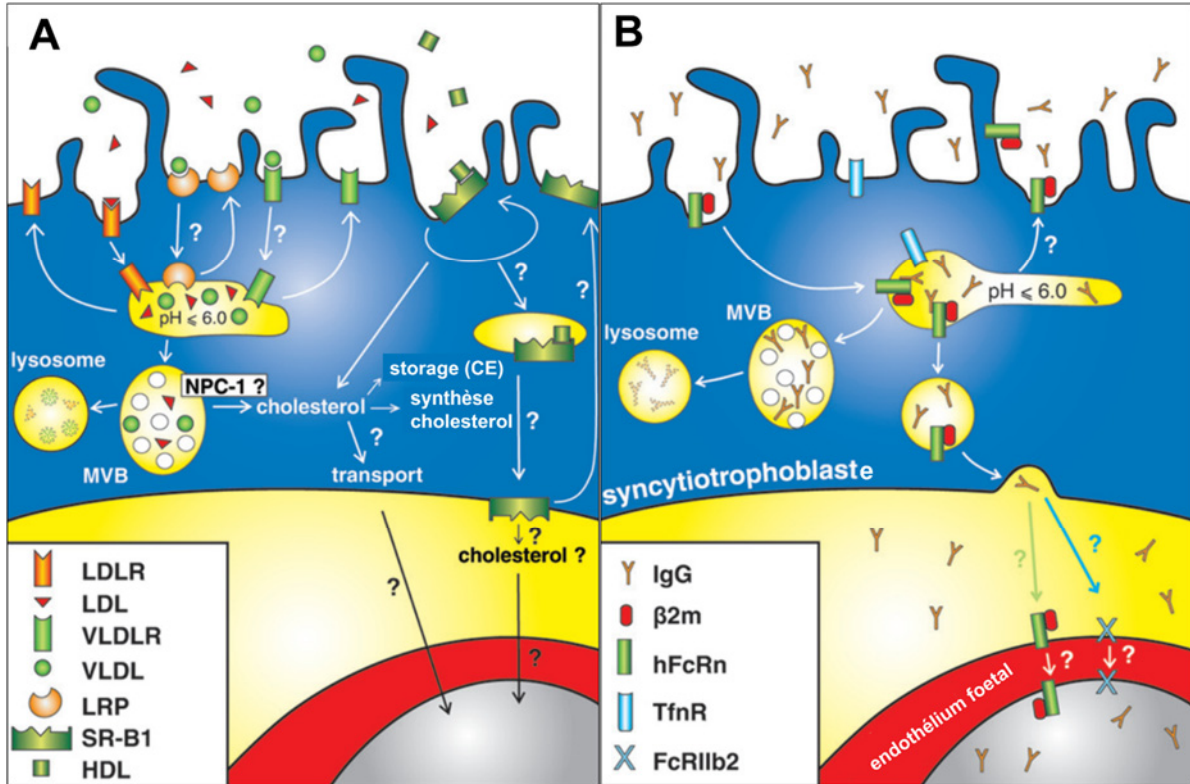
Pour réussir à passer du flux sanguin maternel à celui du fœtus, le VHC doit traverser différentes couches de cellules spécialisées formant la barrière placentaire : STB, les CTB et l'endothélium fœtal. Les STB forment la couche externe des villi, sont en contact direct avec le sang maternel et assurent les échanges de nutriments ainsi que le transfert des IgG de la mère à l'enfant (150). En début de grossesse, le syncytium est accompagné d'une couche sous-jacente de CTB mononucléés formant un épithélium. Plus la grossesse avance et plus cet épithélium se relâche: très peu de CTB sont ainsi retrouvés sous la couche de STB dans le placenta à terme. On a ainsi 3 couches protectrices en début de grossesse et 2 en fin de gestation (Figure 13, page 32) (154). L'expression plus ou moins élevée de plusieurs récepteurs impliqués dans l'entrée du VHC a été démontré autant dans les STB que les CTB (154, 194-197), suggérant la possibilité que le VHC infecte directement le placenta. Ces études n'ont toutefois pas vérifié la présence du brin négatif du génome du VHC, ce qui aurait été un signe incontestable de réplication active du virus dans le placenta. Une autre étude a permis d'observer des particules ressemblant à des virus dans le cytoplasme de CTB en

culture, suggérant l'internalisation du VHC. Bien que le brin d'ARN de polarité négative n'ait pas été détecté, la présence de NS5A à proximité du noyau cellulaire et la détection intermittente de L'ARN du VHC dans le surnageant des trophoblastes en culture suggère une possible réplication du virus dans ces cellules (232). Ainsi, bien que peu d'évidences suggérant une réplication active du VHC dans les cellules placentaires n'aient été rapportées, l'internalisation du virus semble possible.

L'expression de CD81 n'a pas toujours été confirmée sur les trophoblastes (194), contrairement aux autres récepteurs du VHC (LDLr, SRB1, CLDN1 et OCLN), et Shen et al ont démontré que son expression diminuait plus la grossesse était avancée (196). Il est donc possible que le VHC arrive à transiter à travers la barrière placentaire par des mécanismes différents de ceux utilisés pour infecter les hépatocytes et possiblement d'une manière indépendante de sa liaison à CD81. Le VIH-1 est bien connu pour infecter directement les trophoblastes et une étude a démontré qu'il le faisait par un mécanisme indépendant de la liaison gp120-CD4 mais en partie dépendant de la liaison aux HSPGs (233). Ce fait est d'autant plus intéressant qu'il a été démontré que les HSPGs servaient de facteurs d'attachement du VHC à la surface cellulaire via leur interaction avec des résidus positifs situés dans HVR1 (96).

Le VHC utilise plusieurs récepteurs impliqués dans le transport de nutriments et autres molécules vers le fœtus. Le LDLr est impliqué dans le transport des LDL-cholesteryl esters qui seraient internalisés à la surface apicale (côté maternel) des STB par endocytose et dirigés vers les endosomes précoces où l'acidification permettrait la relâche du cargo. Ce dernier serait ensuite dirigé vers les lysosomes où le LDL-cholesteryl ester serait hydrolysé et le cholestérol serait transporté hors des endosomes multivésiculaires (MVB) avec l'aide de NPC1 et pourrait être transporté vers l'espace intervilleux (154) (Figure 15A). NPC1L1, une protéine similaire à NPC1, a récemment été impliquée dans l'entrée du VHC (108). La modulation du contenu en lipoprotéines des virions gérée par HVR1 (95) pourrait donc influencer sa liaison au LDLr et la TV du VHC via cette route hypothétique. De la même manière, SRB1 est aussi exprimé sur les STBs et CTBs et est impliqué dans le transport des lipides : il pourrait donc aussi servir de voie d'internalisation du VHC à travers la barrière placentaire (154) (Figure 15A). Le Tfr est exprimé sur les STBs et assure le transport du fer vers le fœtus (154). Son implication dans l'entrée du VHC a aussi été suggérée (234).

Quoi qu'il en soit, d'autres études seront requises pour déterminer avec plus de précision l'implication de ces différents récepteurs dans la possible internalisation du VHC dans les trophoblastes, notamment des expériences mesurant l'internalisation du VHC par des trophoblastes en culture qui devraient être effectuées en bloquant individuellement les différents récepteurs à l'aide d'Ac spécifiques ou de doses croissantes de leurs ligands respectifs. L'hybridation in situ de l'ARN du VHC et la détection par des anticorps couplés à des billes d'or (immunogold) et microscopie électronique des différentes protéines virales sur des coupes de placenta permettrait aussi de mieux visualiser la localisation du virus dans les différentes couches de la barrière placentaire à différents moments de la grossesse (placenta de grossesses volontairement interrompues), et chez les femmes ayant transmis ou non le virus (placenta à terme).



**Figure 15. Modèles de transport des lipoprotéines (A) et des IgG (B) à travers la barrière placentaire.** A. Le LDL présent dans le sang maternel lie le LDLR à la membrane apicale des STB. Suivant l'endocytose à pH acide dans les endosomes, le LDL est libéré de son récepteur. Le LDLR est recyclé à la membrane apicale alors que le LDL est dirigé vers le compartiment lysosomal où le cholestéryl ester est hydrolysé et la lipoprotéine est dégradée. La sortie du cholestérol libre de l'endosome tardif multivésiculaire (MVB) pourrait dépendre de NPC1. Le cholestérol libre est utilisé pour la synthèse d'hormones dans la mitochondrie ou entreposé sous la forme de cholestéryl ester. SRB1 localisé à la membrane apicale des STB serait responsable de la prise sélective du cholestéryl ester des HDL à la membrane apicale. SRB1 pourrait aussi jouer le rôle de récepteur endocytaire responsable du transport du HDL par transcytose vers la membrane basale. B. Les IgG en haute concentration dans le sang maternel (10-15 mg/mL) sont internalisés à la membrane apicale des STB par endocytose en phase fluide dans les endosomes (pH 6.0) ce qui permet la liaison au FcRn. Le FcRn et l'IgG peuvent ensuite être amené à la membrane plasmique basolatérale ou être recyclés à la membrane apicale. La libération de l'IgG de son récepteur pourrait se produire dans les endosomes à pH neutre ou à la membrane plasmique exposée au stroma (basale) ou au sang maternel (apicale). Les IgG qui ne lient pas le FcRn dans les endosomes apicaux précoces sont transportés par les MVB vers les lysosomes pour y être dégradés. Puisque le FcRn est aussi détecté sur les cellules endothéliales fœtales, il pourrait aussi assurer le transport vers la circulation fœtale. Image tirée et traduite de Fuchs et al. (154) avec permissions de John Wiley and Sons.

Le système immunitaire du nouveau-né, bien que déjà actif depuis la 10<sup>ème</sup> semaine de grossesse, fonctionne d'une manière différente de celui de l'adulte. Les fonctions de l'immunité innée sont diminuées comparé à l'adulte. Les réponses CD4 sont biaisées vers un phénotype tolérogène (Treg) et à médiation humorale (Th2) reflétant la vie in utero pendant

laquelle le système immunitaire fœtal doit tolérer les antigènes maternels non-hérités (235). La réponse anticorps est caractérisée par une faible capacité de réponse des LB (236), la production d'anticorps de faible affinité (hypermutation somatique diminuée) (237) et une incapacité des cellules stromales de la moelle osseuse à supporter la survie à long terme des plasmablastes et leur différenciation en plasmocytes (238). Le transfert transplacentaire des Ac maternels est donc un mécanisme adaptatif qui confère au jeune enfant une protection complémentaire à moyen terme, le protégeant ainsi contre certains pathogènes critiques contre lesquels la mère est immunisée (235). Le transfert des Ac à travers la barrière placentaire s'effectue en partie via le FcRn exprimé par les STBs (Figure 15 B). Ce récepteur possède une forte affinité pour la portion Fc des IgG à pH 6.0 mais une faible affinité à pH 7.4 (239). Vu sa faible affinité pour les IgG en conditions physiologiques, on croit que les anticorps seraient endocytés de manière non spécifique à partir du sang maternel (endocytose de phase fluide) puis seraient rescapés de la dégradation lysosomale par leur liaison au FcRn dans les endosomes à pH 6.0 (240, 241). L'exocytose à pH plus élevé dans le stroma des villi en fin de grossesse, ou sur la couche de CTBs sous-jacente en début de gestation, libérerait les Ac qui diffuseraient vers l'endothélium fœtal et transiterait à travers celui-ci jusqu'à atteindre le flux sanguin de l'enfant par un mécanisme encore inconnu (154). Ainsi, le VHC lié à des Ac non-neutralisants pourrait en théorie traverser la barrière placentaire par ce mécanisme et entrer dans la circulation fœtale, seules les variantes du VHC liées à des Ac liés au FcRn seraient transportées à travers les STBs alors que les virus libres seraient dégradés. Cependant, l'hypothèse suggérant que la TV du VHC se fasse par cette voie fait face à une contradiction. Il existe plusieurs autres molécules liant la portion Fc de IgG (avec différentes affinités), notamment les FcRI, FcRII et FcRIII exprimés entre autre par les cellules de Hofbauer. Ces récepteurs de Fc ont une faible affinité pour les monomères d'IgG mais lient les IgG complexés à des Ag et seraient responsable de leur élimination par les cellules de Hofbauer (240). Dans ces conditions, les virions liés aux IgG n'atteindraient pas la circulation fœtale mais seraient éliminés à moins d'échapper à ce mécanisme.

Chez la femme enceinte infectée par le Cytomégalovirus (CMV), la détection d'Ac faiblement neutralisants a été associée à la TV (242). L'infection du placenta est aussi prévenue par la présence de hauts titres d'AcN (243). Maidji et. al ont pour leur part obtenu des résultats suggérant le transport de CMV via le FcRn à travers les STB, et que ce transport

résultait en l'infection des CTB sous-jacents chez les patientes présentant de faibles taux d'AcN alors que l'infection ne se produisait pas en présence de hauts titres d'AcN (244). Il est donc possible que certaines variantes du VHC associées à des IgG non neutralisantes soient malencontreusement activement transportées de la mère à l'enfant par le FcRn. Cette route de transmission du VHC pourrait aussi, en partie, expliquer pourquoi certaines femmes produisant des AcN transmettent tout de même le VHC, car ces dernières pourraient en fait avoir de hauts titres d'Ac spécifiques au VHC mais non neutralisants, ce qui faciliterait la TV via le FcRn. Toutefois, dans nos conditions expérimentales, la quantité d'Ac non neutralisants n'a pas été évaluée. Il serait intéressant d'évaluer le ratio d'Ac VHC-spécifiques neutralisants/non-neutralisants afin de déterminer si cela influence la TV du VHC.

Bien que le VHC ait un tropisme majoritairement hépatique, l'expression de ses récepteurs n'est pas restreinte aux hépatocytes, et plusieurs études ont détecté la présence son ARN (200, 245-248), et même du brin négatif (intermédiaire de réplication) (249) dans d'autres types cellulaires tels que les PBMCs. Or, des cellules de l'enfant sont retrouvées chez la mère et des cellules maternelles sont retrouvées chez l'enfant, donnant lieu au microchimérisme fœtal et maternel respectivement (210, 250). Les cellules maternelles peuvent d'ailleurs persister très longtemps chez l'enfant, et migrer dans différents organes, incluant le foie (251). De plus, la présence d'ARN du VHC dans les PBMCs est reconnue comme un facteur de risque dans la TV du VHC (199, 200). Aussi, une discordance du CMH-II entre la mère et l'enfant semble diminuer la TV du VHC (252) et du VIH (253), suggérant la possibilité qu'une réaction allogénique de l'enfant envers les cellules maternelles infectées traversant le placenta protégerait contre la TV. Une étude plus récente a démontré que la majeure partie du VHC présente dans les PBMCs se trouvait attachée à la surface des cellules, notamment dans la fraction CD3-négative des PBMCs, soit les cellules NK, les LB et les monocytes (209). Toutes ces cellules ont d'ailleurs été impliquées dans le microchimérisme maternel (254). Il est donc probable que certaines variantes du VHC ayant la capacité de s'attacher à la surface de cellules maternelles soient véhiculées par ces dernières à travers la barrière placentaire et soient délivrées aux cellules de l'enfant, possiblement même directement aux hépatocytes. Puisqu'autant les cellules maternelles que fœtales transitent à travers le placenta, cela pourrait aussi expliquer la possibilité intrigante de la transmission du VHC de l'enfant à la mère suggérée par nos analyses phylogénétiques des réseaux de



variantes chez les couples mère-enfant TVC79-80 et TVC55-56 (Article 2). Le microchimérisme a été observé à des niveaux variables et parfois pas du tout dans certaines grossesses, il serait bien sur intéressant d'évaluer les niveaux de cellules maternelles présentes chez l'enfant (par PCR dans le sang de cordon par exemple) en fonction de la TV du VHC (250, 255).

Tous les mécanismes hypothétiques mentionnés ci-dessus sont reliés à l'affinité de l'enveloppe du VHC pour différents récepteurs ou molécules impliqués d'une manière ou d'une autre dans le transport à travers la barrière placentaire et sont donc influencés par la séquence de l'enveloppe et la réponse humorale neutralisante spécifique au VHC. L'absence d'association entre ces facteurs et la TV du VHC chez les femmes coinfectedes suggère toutefois que ces mécanismes ne sont pas les plus importants dans la TV du VHC lorsque la mère est coinfectede par le VIH-1. Dans ce contexte, bien qu'on ne puisse ignorer le fait que le faible nombre de cas de TV du VHC dans le groupe de femmes coinfectedes puisse avoir empêché la détection d'une corrélation entre la neutralisation, la diversité et la TV du VHC, nos résultats suggèrent plutôt l'existence d'un mode de TV non spécifique du VHC.

### 4.3 Goulot d'étranglement lors de la TV du VHC

Les résultats des tests de neutralisation dans notre étude du goulot d'étranglement dans la TV du VHC (Article 2) peuvent sembler contre-intuitifs lorsqu'analysés indépendamment: on observe une plus grande (10X) fraction de la quasiespèce maternelle transmise de la mère à l'enfant chez les femmes coinfectées en dépit du fait que ces mères présentent une réponse neutralisante significative alors que les mères infectées par le VHC seul ne neutralisent pas et transmettent peu de variantes. Ces résultats prennent toutefois tout leur sens à la lumière des résultats de l'étude dans la cohorte de 42 femmes enceintes (Article 1). En effet, les deux mères mono-infectées incluses dans l'étude du goulot d'étranglement (TVC79 et TVC189) font partie du groupe faible diversité, ce qui explique leur faible réponse neutralisante et la TV du VHC. De plus, l'étude chez la femme enceinte a révélé que la réponse neutralisante n'était pas impliquée dans la TV du VHC chez les femmes coinfectées, ce qui suggère un mode de transmission non-spécifique de l'enveloppe. Ce mode de transmission pourrait expliquer que malgré la présence d'une réponse neutralisante efficace, des brèches dans la barrière placentaire laisseraient passer plusieurs variantes, indépendamment de leur pouvoir infectieux ou de leur affinité pour les différents transporteurs potentiellement impliqués dans la TV. La transmission de très peu de variantes chez les femmes mono-infectées suggère un mode de TV spécifique de l'enveloppe dans ce contexte: les variantes ayant la séquence d'enveloppe optimale pour être transportées à travers la barrière placentaire sont transmises mais peu nombreuses, et une réponse neutralisante plus efficace aurait potentiellement forcé ces variantes à muter vers une séquence d'enveloppe sous-optimale pour la TV.

La présence d'un goulot d'étranglement relâché laissant passer une grande quantité de variantes de la mère à l'enfant, chez les mères coinfectées abonde donc aussi en faveur d'un mode de TV non-spécifique. L'hypothèse la plus simple serait que l'infection par le VIH-1 entraîne une fragilisation ou des dommages à la barrière placentaire, ce qui entraînerait des microhémorragies et le passage du sang maternel vers la circulation sanguine fœtale. Alors qu'une variante fortement majoritaire n'est pas transmise dans le couple mère-enfant TVC189-190, suggérant une barrière spécifique à la TV, des variantes présentant les fréquences les plus élevées sont transmises en plus de variantes minoritaires dans les couples mère-enfant TV385-386 et TVC55-56 (Article 2), démontrant une relation entre la fréquence

des variantes et leur chance de transmission et suggérant encore une fois un mode de TV du VHC non-spécifique chez les mères coinfectedes. L'infection par le VIH-1 est associée à une plus grande incidence de chorio-amnionite (256-259) et de déciduite (260), deux conditions qui pourraient endommager la barrière placentaire et faciliter la transmission de plusieurs variantes du VHC. Il faut cependant noter qu'aucune des patientes incluses dans nos études ne présentait de signes d'inflammation placentaire. Burton et ses collègues ont pourtant détecté des dommages placentaires d'intensités variables dans tous les placentas examinés (n=17) provenant de femmes infectées par le VIH-1 et ce, sans qu'il n'y ait aucune évidence d'inflammation chronique (261). Il serait donc concevable que la barrière placentaire des femmes coinfectedes ait été fragilisée malgré l'absence de signes histologiques d'inflammation. Une étude plus récente effectuée dans un modèle de rat a démontré que la protéine virale Nef du VIH-1 induisait des brèches dans la barrière placentaire, potentiellement via l'induction de cytokines proinflammatoires (262). Cependant, il faut être prudent dans l'extrapolation de ces résultats à l'humain vue la grande variabilité inter-espèce de l'architecture du placenta et de l'IMF (150).

Un autre mécanisme pouvant expliquer un goulot d'étranglement moins restreint chez les femmes coinfectedes serait la facilitation de l'infection placentaire du VHC par le VIH-1. Le VIH-1 est bien connu pour faciliter l'infection du placenta et la transmission transplacentaire de plusieurs pathogènes. Le VPH16 est retrouvé 2 fois plus souvent dans le placenta de femmes coinfectedes par le VIH-1 que chez celles infectées par le VPH16 seulement (263). La coinfection par le VIH-1 facilite l'infection du placenta et la TV de *Plasmodium falciparum*, l'agent étiologique de la malaria (264), dont les facteurs d'entrée pour la phase hépatique de la maladie incluent, de façon intrigante, le CD81 et SRB1 (265, 266). Sans compter qu'en absence de traitement antirétroviral administré à la femme enceinte coinfectede par le VHC et le VIH-1, le taux de TV du VHC est jusqu'à 4 fois plus élevé que chez les femmes enceintes infectées par le VHC seul (206, 212, 267). Une étude récente a toutefois démontré que lorsque traitées par HAART (Highly active antiretroviral therapy), le taux de TV du VHC chez les femmes coinfectedes était similaire à celui des femmes infectées par le VHC seul (268).

La dernière étape dans la TV du VHC est l'établissement du virus chez l'enfant. En effet, même les virions qui ont pu déjouer le système immunitaire de la mère et franchir la

barrière placentaire doivent ensuite arriver à échapper au système immunitaire de l'enfant et à persister chez ce dernier. Les enfants nés de mères infectées par le VIH-1 ont une immunité altérée et sont plus susceptibles aux infections (269-271). Il est donc possible que cet état permette à de plus nombreuses variantes du VHC de s'établir chez les enfants nés de mères coinfectées. Dans le couple mère-enfant TV385-386, 109 variantes sont partagées entre l'échantillon de la mère et ceux de l'enfant. De ces 109 variantes, 92 ne sont présentes chez l'enfant que dans le sang de cordon (CB), et seulement 17 variantes partagées sont retrouvées chez l'enfant à 1 mois. Il semble donc qu'un grand nombre de variantes ait pu traverser la barrière placentaire et se retrouver chez l'enfant pendant la grossesse mais que la plupart n'aient pas réussi à s'établir chez ce dernier. L'immunité fœtale et/ou pendant le premier mois de vie de cet enfant a donc été en mesure de restreindre le goulot d'étranglement. Dans le cas du couple TVC55-56, les 184 variantes partagées ont bien été transmises. Étant donné que nous n'avions pas d'échantillon de CB, il nous est impossible d'évaluer si l'immunité de l'enfant a pu restreindre la quantité de variantes ayant pu traverser le placenta ou non.

Dans le cas de la patiente séronégative, on a observé 5 variantes partagées entre les différents échantillons de l'enfant et celui de la mère ce qui constitue 8.8% des variantes composant la quasiespèce. Il est toutefois difficile de comparer ces données avec les résultats obtenus dans l'étude du goulot d'étranglement car les profondeurs d'analyse sont très différentes (Article 3 : clonage/séquençage Sanger, 17 à 50 séquences analysées par échantillon / Article 2 : séquençage à haut débit, 623 à 11,270 séquences analysées par échantillon). Ceci dit, une fraction de quasiespèce transmise de 8.8% serait 2 fois plus importante que ce qu'on observe chez les patientes coinfectées et pourrait être le reflet de l'absence d'immunité humorale VHC spécifique capable de restreindre l'infection chez cette patiente. L'exposition chronique aux antigènes du VHC pendant la vie fœtale pourrait avoir induit une certaine « tolérance » immunitaire face au VHC.

#### 4.4 Moment de la TV du VHC

On ne sait pas exactement à quel moment la TV du VHC se produit. C'est en raison d'évidences indirectes, telles que la détection d'une charge virale élevée chez l'enfant dans les premiers jours de vie et l'inefficacité de la césarienne élective à réduire le taux de TV, qu'on supposait que l'infection de l'enfant pouvait se produire in utero (182, 215). Les résultats de notre étude portant sur la TV du VHC prouvent que le passage du VHC de la mère à l'enfant pourrait se produire assez tôt pendant la grossesse (Article 2). Dans un cas particulier, l'intervalle estimé du moment de transmission remonte même jusqu'à la fin du premier trimestre (12.8 semaines de gestation). La grossesse étant un état physiologique en constante évolution, il est très concevable que la transmission du VHC soit plus ou moins favorisée à certains moments particuliers. Explorons donc ces possibilités en relation avec les différents modes de TV du VHC suggérés plus tôt et en comparaison avec la TV d'autres virus.

La perfusion du placenta par le sang maternel ne se produit qu'à partir des semaines 10 à 12 de gestation. Ainsi, il est concevable que, dans l'éventualité où le VHC se transmette verticalement via le sang maternel (ce qui est fort probable puisque le VHC se transmet essentiellement par voie hématogène), le passage du virus de la mère à l'enfant ne puisse se produire avant ce moment. L'estimation du moment de transmission à au plus tôt 12.8 semaines de gestation chez le couple mère-enfant TVC31-32 est donc en accord avec ces données. Avant le moment où le sang maternel remplit l'espace intervilloux, les trophoblastes sont en contact avec les cellules de la décidua uniquement. Bien que la présence du VHC dans la décidua n'ait pas été évaluée dans le cadre de notre étude, le tropisme cellulaire relativement restreint du VHC (272) et l'absence d'ARN du VHC dans le liquide amniotique (192) suggèrent que le VHC n'infecterait pas activement les cellules déciduales. La TV en début de grossesse est d'ailleurs observée essentiellement chez des virus possédant un tropisme cellulaire très large et infectant autant les cellules déciduales et épithéliales que les trophoblastes, tels que le CMV et le virus Zika (ZIKV) (273-275). Ces 2 virus sont d'ailleurs détectés dans le liquide amniotique et ont des taux de TV élevés dans les cas où la mère présente une infection active (151, 276, 277). Ce n'est vraisemblablement pas le cas du VHC, où le très faible taux de TV même en présence d'une charge virale détectable suggère que le passage du virus serait restreint par le placenta.

Le foie fœtal se développe à partir de cellules souches progénitrices d'hépatocytes. La spécification hépatique se produit aux jours 8.5-9 du développement embryonnaire chez la souris, ce qui correspond environs aux jours 18-20 chez l'humain (278). Ces hépatoblastes se différencient ensuite en hépatocytes matures aux jours 56-58 suivant la fertilisation de l'ovule, soit à la 8<sup>ème</sup> semaine de grossesse (279, 280). La permissivité à l'infection par le VHC diffère selon les différentes lignées de cellules hépatiques. Elle apparaît à partir des cellules souches progénitrices d'hépatocytes et corrèle avec la translocation de l'OCLN du cytoplasme vers la membrane plasmique (281, 282). Les hépatoblastes sont les cellules hépatiques dans lesquelles la réplication du VHC serait la plus efficace. Par contre, la production de virus infectieux par ces cellules est beaucoup moins importante que par les hépatocytes matures (282). Alors que CD81 est présent à tous les stades de développement des cellules hépatiques, l'expression des autres récepteurs du VHC est plus importante dans les hépatocytes matures que dans les hépatoblastes et les cellules souches progénitrices d'hépatocytes (282). Ainsi, bien que la TV du VHC puisse théoriquement se produire très tôt durant la grossesse via l'infection des hépatoblastes fœtaux, l'infection productive ne serait présente qu'au moment où des hépatocytes matures seraient observés dans le fœtus, soit à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Nos estimations du moment de transmission sont donc valides puisqu'aucune n'a évalué le moment de transmission avant cette période (Article 2).

Le transport de nutriments à travers le placenta évolue au cours de la grossesse et dépend de la taille du placenta (surface d'échange), du flux sanguin irrigant ce dernier et de la capacité/disponibilité des transporteurs (283). Morphologiquement, la surface de contact et de transport du placenta augmente donc à mesure que la grossesse avance. La probabilité du passage du VHC à travers la barrière placentaire deviendrait ainsi de plus en plus importante avec l'augmentation de la surface de contact entre le sang contaminé de la mère et la couche de STB assurant le transport des nutriments. Cela pourrait en partie expliquer que la plupart des événements de TV surviennent peripartum (215). L'expression de certains récepteurs et transporteurs potentiels du VHC à la surface des trophoblastes, notamment le CD81, le LDL-R et SRB1, diminue cependant avec la progression de la grossesse, et pourrait en partie contrecarrer l'augmentation de la taille du placenta (196, 284, 285). Le transfert du fer via le Tfr1 s'intensifie quant à lui à mesure que la grossesse avance (286).

La TV du VHC via le récepteur FcRn est une hypothèse intéressante qui n'a, à ma connaissance, jamais été évoquée jusqu'à ce jour. Le transport transplacentaire des Ac à travers le placenta ne commence qu'à partir de la 13<sup>ème</sup> semaine de grossesse, soit un peu après la perfusion du placenta par le sang maternel, et augmente de façon linéaire par la suite (239, 287). Le transfert ne serait significatif qu'à partir de la 26<sup>ème</sup> semaine de grossesse, au moment où la couche de CTB présente sous les STB devient très diffuse (240). Ces informations coïncident aussi avec nos résultats où les estimations du moment de TV chevauchent toutes la 26<sup>ème</sup> semaine de grossesse, et où l'estimation du moment de transmission le plus précoce se produit à la 12.8<sup>ème</sup> semaine de grossesse (Article 2).

La TV du VHC via l'utilisation de cellules transporteuses est aussi un mécanisme qui peut évoluer pendant la grossesse. Le microchimérisme foetal (présence de cellules de l'enfant dans le sang maternel) débute très tôt pendant la grossesse, environs à la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation (250) (un rapport fait même état de microchimérisme foetal à 4 semaines de grossesse (288)). Le microchimérisme maternel, pour sa part, semble se produire plus tard, soit aux alentours de la 20<sup>ème</sup> semaine (255), le plus tôt recensé étant à 13 semaines (289). Le transfert bidirectionnel augmente aussi avec la progression de la grossesse et atteint un pic en fin de gestation (250). Si la TV du VHC se produisait de cette façon, c'est donc le microchimérisme maternel qui en serait responsable, et nos résultats concordent encore là avec les données de la littérature.

Les routes de TV impliquant l'attachement du VHC à des transporteurs (donc spécifique de la séquence de l'enveloppe) semblent donc peu plausibles en tout début de grossesse mais leur vraisemblance s'accroît en général à mesure que la grossesse avance ce qui concorde avec nos estimations et avec le fait que la plupart des cas de transmission se produisent en fin de gestation. Selon les résultats obtenus pour l'ensemble de la cohorte de femmes enceintes (Article 1), ce seraient les femmes mono-infectées qui transmettraient le VHC de façon spécifique de l'enveloppe, et la réponse neutralisante serait importante pour limiter la TV. Malheureusement, il ne nous a pas été possible d'obtenir des échantillons de tous les enfants infectés verticalement, et l'estimation du moment de transmission n'a pu être évalué que pour un seul enfant né d'une mère mono-infectée. Il est donc difficile d'évaluer s'il existe des différences dans les estimés du moment de TV entre les femmes mono- et coinfectées. Cependant, chez les enfants nés de mères coinfectées, l'étendue de l'intervalle

crédible du moment de transmission est légèrement plus large que pour l'enfant dont la mère n'est infectée que par le VHC. Selon nos résultats (Article 2), les patientes coinfectées transmettent beaucoup plus de variantes et ce, indépendamment de la réponse neutralisante maternelle. Nous avons aussi proposé que cela suggère un mode de TV non spécifique de l'enveloppe, possiblement dû à une fragilisation de la barrière placentaire. Ainsi, à partir du moment où le flux sanguin maternel irrigue le placenta, des variantes peuvent commencer à transiter vers le fœtus à travers d'éventuelles lésions placentaires. Il est possible que le passage des différentes variantes se produise à des moments variés pendant la grossesse, ce qui pourrait expliquer l'étendue plus grande dans les estimations du moment de la TV.



#### **4.5 Les mécanismes impliqués dans la TV du VHC sont fondamentalement différents selon que la mère est infectée par le VHC seul ou coinfectée par le VHC et le VIH-1.**

L'interprétation des résultats obtenus dans l'étude de la quasiespèce du VHC pendant la grossesse et du goulot d'étranglement dans la TV du VHC en fonction de la réponse neutralisante spécifique au VHC a permis de révéler des différences frappantes entre les cas d'infection par le VHC seulement et les cas de coinfection maternelle par le VHC et le VIH-1, notamment en ce qui a trait à l'importance de la réponse neutralisante maternelle dans la prévention de la TV du VHC et aux caractéristiques du goulot d'étranglement.

Nous pouvons donc proposer deux modèles différents de TV du VHC suggérant l'implication de mécanismes fondamentalement différents selon le statut de coinfection de la mère (Figure 16). Dans les cas où la mère est infectée par le VHC seulement, l'absence de réponse neutralisante laisse la quasiespèce évoluer selon le fitness relatif des variantes qui la compose (prépondérance de la ou des variantes les plus adaptées et diversité faible). Dans ce contexte, les quelques variantes possédant une séquence d'enveloppe optimale pour la TV sont transmises (goulot d'étranglement étroit). Chez les patientes présentant une réponse neutralisante efficace, on observe une diversification de la quasiespèce par l'émergence de variantes d'échappement mais possédant une enveloppe sous-optimale pour la TV, ce qui la rend moins efficace. Chez les femmes enceintes coinfectées, la quasiespèce se diversifie aussi en présence d'AcN. Malgré cela, la TV peut tout de même survenir et implique plusieurs variantes, indépendamment de leur enveloppe (goulot d'étranglement relâché). Nous sommes donc en présence de deux modes de transmission distincts selon le statut de coinfection de la mère : un mode spécifique de l'enveloppe chez les mères mono-infectées et un mode non-spécifique chez les mères coinfectées.

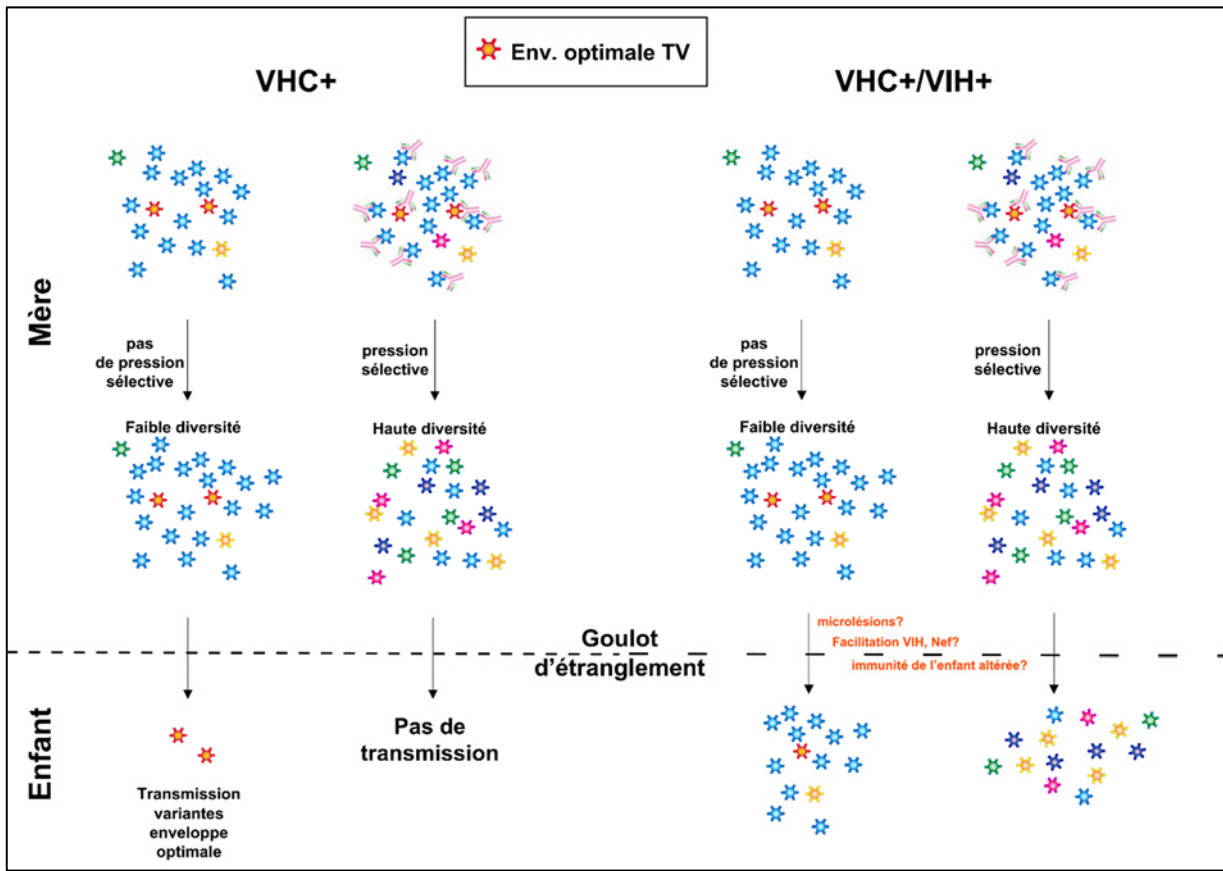


Figure 16. Modèles de TV du VHC chez la femme enceinte infectée par le VHC seulement ou coïnfectée par le VHC et le VIH-1.

#### 4.6 Forces et faiblesses de l'étude

Les études précédemment publiées qui ont comparé la diversité de la quasiespèce en fonction de la réponse humorale l'ont fait chez un nombre très restreint de patients (44, 48, 60, 221-223, 227). Aussi, ces études ont généré une quantité limitée de séquences pouvant être analysées afin de décrire la composition de la quasiespèce, et seulement 2 d'entre elles ont évalué la réponse anticorps spécifiquement neutralisante à l'aide de VHCpp (44, 60). Notre étude chez la femme enceinte comporte ainsi plusieurs forces. L'utilisation du séquençage à haut débit d'amplicons a permis une profondeur d'analyse de la composition de la quasiespèce inégalée à ce jour chez la femme enceinte. Le pyroséquençage de masse a permis l'obtention de séquences nombreuses et assez longues pour analyser en profondeur les variantes complètes d'une région couvrant les 3 HVR, ce qui n'aurait pu être effectué avec une autre technique. Cela nous a permis de caractériser pour la première fois et en profondeur le goulot d'étranglement dans la TV du VHC, et d'obtenir suffisamment de données pour estimer le moment de la TV. Le nombre de patientes incluses dans l'étude (n=42) chez la femme enceinte en fait aussi l'étude de diversité du VHC et d'analyse de la réponse neutralisante la plus complète jamais effectuée. Grâce à cela, nous sommes les premiers à avoir démontré une association statistiquement significative entre la diversité de la quasiespèce basée sur HVR1, les pressions sélectives et la réponse humorale neutralisante. Il faut cependant garder en tête que seule une petite région du génome du VHC a été analysé dans cette étude. Le séquençage à haut débit du génome complet du VHC aurait probablement permis obtenir plus d'informations sur les différentes régions du génome du VHC qui sont soumises à des pressions de sélection différentielles pendant la grossesse. Toutefois, l'analyse du génome complet aurait diminué la profondeur de l'analyse de la quasiespèce et n'était clairement pas réalisable compte tenu des ressources à notre disposition.

Le séquençage d'amplicons dérivés de l'amplification par PCR de l'ARN viral total extrait du sérum pourrait induire un biais dans les fréquences relatives des variantes détectées causé par l'amplification exponentielle et la présence de concentrations variées des variantes présentes dans le sérum. L'amplification à partir de génome unique (single genome amplification) est une technique qui permet de conserver la profondeur de l'analyse en éliminant potentiellement ce biais. Cependant, des études ayant comparé les deux techniques

dans la caractérisation de la quasiespèce du VIH-1 ont déterminé que les deux méthodes étaient équivalentes (290, 291). De plus, l'amplification à partir de l'ARN viral total est moins laborieuse et plus abordable. Par contre, la quasiespèce du VHC étant beaucoup plus complexe que celle du VIH, il est possible que les différences entre les deux techniques aient été sous estimées.

L'utilisation du système de VHCpp comporte aussi des forces et faiblesses. Il permet d'abord d'évaluer la réponse spécifiquement neutralisante à différents moments, ce qui est un avantage comparé à la caractérisation de paramètres comme la diversité dans des échantillons pré- et post-séroconversion (48, 227) ou en contexte de présence ou de déficit dans la production d'anticorps (222, 223). Le système n'est toutefois pas parfait, et la détection des niveaux de neutralisation pourrait avoir été biaisée par différents facteurs. Le profil de glycosylation des protéines d'enveloppes du VHC incorporées à la surface des VHCpp est modifié par rapport aux virions naturels (292). Ceci est dû au fait que l'assemblage du VHC se déroule normalement au niveau du RE, alors que celui des VHCpp prend place à la membrane plasmique, conséquence des gènes de structure du MLV utilisés dans ce système (293). Les protéines d'enveloppe du VHC sont exprimées au niveau du RE dans l'infection naturelle et sont incorporées aux virions à ce moment. Dans la production des VHCpp, E1 et E2 sont effectivement exprimées et retenues au RE, mais leur surexpression entraîne des fuites vers la membrane plasmique. Elles voyagent donc seules du RE vers la surface cellulaire, ce qui semble altérer leur glycosylation et pourrait modifier leur neutralisation. La neutralisation des VHCpp pourrait aussi être altérée par leur contenu en lipoprotéines, qui diffère à cause de leur assemblage tardif et de leur production dans des cellules non hépatiques (294). La production des VHCpp en présence de sérum humain pourrait rétablir un contenu lipoprotéique plus similaire à celui observé *in vivo* et de mieux étudier les différences dans la neutralisation et la facilitation de l'infection par les lipoprotéines selon les différentes variantes de HVR1 (295).

L'utilisation VHCpp autologues pour les tests de neutralisation devrait être plus sensible pour détecter des réponses neutralisantes propre aux variantes présentes dans la quasiespèce des patients que l'utilisation de particules hétérologues (44, 60). Notre équipe est d'ailleurs la seule à avoir adapté le système de VHCpp afin d'y inclure les séquences dérivées de la quasiespèce de nos patientes. À l'origine, nous avons tenté de cloner une

portion beaucoup plus grande de la région N-terminale d'E2 (acides aminés 384-481) comprenant les trois régions hypervariables. Malheureusement, la grande majorité de ces VHCpp n'étaient pas infectieuses ce qui empêcha leur utilisation dans les tests de neutralisation. Soupçonnant le bouleversement d'interactions importantes à la structure d'E2 par l'introduction d'une séquence exogène dans la VHCpp de référence, nous avons effectué des essais d'infection en introduisant des segments autologues de plus en plus petits. Ces tests nous ont permis de conclure que le changement de la région HVR1 seulement permettait d'obtenir une majorité de VHCpp autologues infectieuses. Cependant, les différentes variantes de VHCpp produites restent néanmoins presque identiques ce qui eu comme conséquence la quasi absence de neutralisation différentielle des variantes testées. En effet, la majorité des sérums des patientes arrivaient à neutraliser soit toutes les variantes testées soit aucune. On peut d'ailleurs observer ce phénomène dans la figure S3C où l'on voit clairement deux groupes distincts en termes de neutralisation moyenne des variantes testées. La production des VHCpp en présence de sérum humain ou le clonage des gènes complets d'E1 et d'E2 dérivés des patients pourrait avoir permis une détection plus précise de l'activité neutralisante. Aussi, à cause de la complexité des expériences de neutralisation, nous avons décidé de ne tester qu'une seule et même concentration d'Ac totaux pour chaque patiente (0.5 mg/ml). Cette concentration fut déterminée à partir d'une courbe dose-réponse (Ac-%Neutralisation) effectuée pour une patiente (TVC55). La CI50 (Concentration inhibant à 50% l'infection par la VHCpp de référence) de 0.5 mg/ml d'Ac fut ainsi utilisée pour tous les autres essais. Évidemment, la concentration des Ac VHC-spécifiques dans le pool d'Ac totaux extrait varie certainement d'une patiente à l'autre. L'évaluation de l'activité neutralisante de différentes dilutions des Ig pour chaque échantillon aurait peut-être permis de détecter la présence d'Ac neutralisants spécifiques au VHC en trop faible quantité pour avoir un effet lorsque la concentration de 0.5 mg/ml d'Ac totaux est utilisée et ainsi permettre la détection de plus petites différences de neutralisation entre les différentes variantes. Notez que nous avons privilégié l'usage d'Ig purifiés au lieu du sérum car certains sérums augmentent ou diminuent l'infectivité des VHCpp ce qui rend la comparaison avec un sérum contrôle impossible et biaiserait les résultats. Malgré tout, les tests de neutralisation autologue dans l'étude du goulot d'étranglement (Article 2) ont généré des résultats frappants illustrant parfaitement le phénomène de l'immunité humorale passivement acquise dans la première année de vie en relation avec les changements importants survenant dans la

quasi-espèce du VHC chez l'enfant à 1 an. Finalement, l'étude de la neutralisation de VHCpp hétérologues génotype-spécifiques nous a permis d'obtenir un profil de neutralisation général chez presque toutes les patientes de la cohorte. L'utilisation d'un panel de VHCpp hétérologues de différents génotypes aurait toutefois pu permettre de détecter le potentiel de neutralisation croisée des Ac des patientes.

#### **4.7 Futures avenues de recherche**

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est en général inhibée pendant la grossesse, et il a été démontré que cette modulation pouvait permettre l'émergence et la TV de variantes du VHC possédant un fitness répliatif élevé (296). Les conclusions du présent travail pointent vers une importance prédominante de la réponse humorale par rapport à la réponse cellulaire dans la prévention de la TV du VHC. Par contre, les réponses à médiation cellulaire chez la femme enceinte et l'enfant infecté verticalement n'ont pas été directement évaluées dans notre étude. L'analyse de régions génomiques du VHC codant pour des épitopes restreints par le CMH-I aurait donc été informative quant à l'importance de la réponse cellulaire dans la sélection de variantes hautement répliatives qui pourraient être impliquées la TV. La région de l'enveloppe étudiée contient plusieurs épitopes de LT qui pourraient être utilisés pour caractériser l'importance de l'évasion immunitaire de la réponse cellulaire pendant la grossesse. L'étude des niveaux d'infectivité ou d'attachement des différentes variantes observées chez les patientes de notre cohorte pourrait aussi permettre de mieux caractériser les modes de transmissions hypothétiques évoqués dans le présent travail. L'analyse des quasiespèces basées sur HVR2 et HVR3 en isolation sont aussi d'autres informations qui pourraient être extraites des données de séquençage permettant l'évaluation de leur diversité et de leurs niveaux de sélection respectifs pendant la grossesse ainsi que leur implication dans le goulot d'étranglement.

## Conclusion

Le VHC est hautement prévalent mondialement et affecte nombre de femmes enceintes et d'enfants. La TV pendant la grossesse ou l'accouchement est la principale cause de l'hépatite C pédiatrique, et ne peut être présentement prévenue par aucun moyen. Bien que plusieurs facteurs de risques aient été identifiés dans la TV du VHC, les mécanismes précis et les déterminants des variantes du VHC impliquées dans la TV sont encore mal compris. Aussi, bien qu'une modulation de la pathogénèse de l'hépatite C ait été observé pendant la grossesse qui pourrait être associée à des changements transitoires de la réactivité immunitaire chez la gestante, on ne sait que très peu de choses sur l'influence de la réponse humorale maternelle sur l'évolution du VHC pendant la grossesse et sur la TV du VHC.

Dans le but d'étendre nos connaissances sur la pathogénèse du VHC chez la femme enceinte et l'enfant, nous avons comme objectifs de caractériser les relations entre la réponse neutralisante et la composition de la quasiespèce du VHC pendant la grossesse et pendant la première année de vie de l'enfant infecté verticalement, et d'évaluer leur influence sur la TV du VHC. Nous avons donc construit un portrait détaillé de la quasiespèce du VHC chez 42 femmes enceintes infectées par le VHC seulement ou coinfectées par le VHC et le VIH-1, et évalué leur réponse neutralisante VHC-spécifique. Chez 5 couples mère-enfant, nous avons aussi caractérisé le goulot d'étranglement dans la TV du VHC, estimé le moment où elle se produisait pendant la grossesse, et évalué la réponse neutralisante des enfants en début de vie.

L'étude de la quasiespèce chez la femme enceinte a permis d'observer des niveaux de diversités très variés autant chez la femme enceinte infectée par le VHC seul que chez les patientes coinfectées. Nous avons aussi pu démontrer que l'évolution de l'enveloppe du VHC était fortement associée à la réponse neutralisante autant chez la femme enceinte que chez l'enfant. L'analyse a aussi révélé l'importance des pressions de sélection exercées sur le VHC par la réponse neutralisante maternelle pendant la grossesse pour prévenir la transmission à l'enfant chez les femmes mono-infectées, et a permis d'identifier une haute diversité de la quasiespèce, reflet d'une activité neutralisante efficace, comme un nouveau facteur de protection contre la TV du VHC. Chez les femmes coinfectées, ce facteur protectif n'était pas observé, suggérant un mode de transmission différent en présence du VIH-1.



La caractérisation du goulot d'étranglement dans la TV du VHC a permis de démontrer que la TV impliquait une faible quantité de variantes chez les mères mono-infectées, alors qu'en présence de coinfection plusieurs variantes étaient transmises, suggérant encore une fois des voies de TV différentes. Grâce à ces informations, nous avons proposé deux modèles de TV du VHC : un mode enveloppe-spécifique chez les femmes mono-infectées, suggérant une restriction par le placenta et le transport sélectif de certaines variantes, et une voie non-spécifique chez les patientes coinfectées, suggérant un passage de masse via la fragilisation de la barrière placentaire. Ces travaux ont aussi permis d'émettre plusieurs hypothèses quant au transport spécifique du VHC à travers la barrière placentaire qui pourront être explorées dans de futurs travaux de recherche.

Les résultats de nos études pourraient informer de futures stratégies de prise en charge des femmes enceintes infectées par le VHC. En effet, avec le récent développement de médicaments très efficaces pour guérir l'infection, il est légitime de se demander s'il faudra pousser l'évaluation de leur innocuité chez la femme enceinte ou recommander un traitement pré-conception. La question du moment le plus favorable pour initier un traitement pendant la grossesse est aussi importante. À la lumière de nos résultats, il semble qu'un traitement chez la femme enceinte devrait être administré au plus tard à la fin du premier trimestre de grossesse, vu les estimations très précoces du moment de la TV. Nos conclusions quant à l'importance d'une réponse neutralisante efficace pour restreindre la TV suggèrent aussi qu'un traitement permettant de renforcer la réponse humorale de la femme enceinte, comme la vaccination, pourrait être efficace mais seulement chez les femmes mono-infectées.

Les résultats de nos travaux ont donc apporté plusieurs informations importantes sur l'évolution de la quasispèce du VHC pendant la grossesse, sur l'importance de la réponse neutralisante maternelle dans la prévention de la TV, et sur la nature du goulot d'étranglement lors de la TV du VHC. Malgré le déploiement d'agents antiviraux très efficaces, l'éradication du VHC est loin d'être accomplie au niveau mondial. Nos conclusions ouvrent la voie vers de nombreuses pistes de recherche qui pourraient permettre l'identification des mécanismes précis impliqués dans la TV et peut-être d'enrayer la propagation de la maladie chez les enfants.

# Annexe

## *Review*

### **Pathogenesis of Hepatitis C During Pregnancy and Childhood (Viruses. 2012 Dec; 4(12): 3531–3550)**

**Armelle Le Campion<sup>1</sup>, Ariane Larouche<sup>1,2</sup>, Sébastien Fauteux-Daniel<sup>1,2</sup>  
and Hugo Soudeyns<sup>1,2,3,\*</sup>**

<sup>1</sup> Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175  
Côte Sainte-Catherine, local 6735, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada

<sup>2</sup> Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de  
Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ.  
Centre-ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:  
hugo.soudeyns@recherche-ste-justine.qc.ca; Tel.: +1 514 345-4931 #3907; Fax: +1 514  
345-4794

---

**Abstract:** The worldwide prevalence of HCV infection is between 1% and 8% in pregnant women and between 0.05% and 5% in children. Yet the pathogenesis of hepatitis C during pregnancy and in the neonatal period remains poorly understood. Mother-to-child transmission (MTCT), a leading cause of pediatric HCV infection, takes place at a rate of <10%. Factors that increase the risk of MTCT include high maternal HCV viral load and coinfection with HIV-1 but, intriguingly, not breastfeeding and mode of delivery. Pharmacological prevention of MTCT is not possible at the present time because both pegylated interferon alfa and ribavirin are contraindicated for use in pregnancy and during the neonatal period. However, this may change with the recent introduction of direct acting antiviral agents. This review summarizes what is currently known about HCV infection during pregnancy and childhood. Particular emphasis is placed on how pregnancy-associated immune modulation may influence the progression of HCV disease and impact MTCT, and on the differential evolution of perinatally acquired HCV infection in children. Taken together, these developments provide insights

into the pathogenesis of hepatitis C and may inform strategies to prevent the transmission of HCV from mother to child.

**Keywords:** Hepatitis C virus; pathogenesis; mother-to-child transmission; pediatrics

---

## 1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection affects 130 to 170 million people worldwide, which accounts for 2 to 3 % of the world's population [1]. This figure includes women of reproductive age and children. The prevalence of HCV infection in pregnant women is between 1 to 2 % in the United States and Europe but may be as high as 8% in some developing countries [2-4]. HCV is transmitted via parenteral exposure to infected blood or contaminated materials, commonly in the context of injection drug use, and, less commonly, following sexual contacts with HCV-infected partners [5-7]. Mother-to-child transmission (MTCT) of HCV has been clearly documented, with reported rates averaging 5-10% [8-16]. Before 1992, pediatric HCV infection was predominantly associated with iatrogenic transmission. That changed following the implementation of universal screening of blood and blood products, when MTCT became the leading source of HCV acquisition in children. Unfortunately, to this day, most cases of hepatitis C in children from resource-limited settings can be traced to transfusion of inadequately-screened blood products and/or parenteral transmission [17,18]. Consistent with this, the prevalence of pediatric HCV infection ranges from 0.05% to 0.36% in developed countries and between 1.8% and 5% in the developing world [19,20].

The pathogenesis of HCV during pregnancy and the neonatal period remains poorly understood. During pregnancy, the maternal immune system must at the same time develop tolerance to paternal alloantigens to prevent maternal immune aggression against the foetus and maintain active immunity against HCV to protect both mother and foetus from the infection. Furthermore, this modulation of immune responses differs between the different stages of pregnancy [21]. How does pregnancy-associated immune modulation influence the progression of HCV infection and impact MTCT? This review will summarize what is currently known about HCV-specific immune responses on the maternal side, at the materno-foetal interface, and on the foetal side. Understanding how mother and foetus face up to HCV may provide some perspectives on possible clinical intervention as new antiviral treatments for hepatitis C, including direct-acting antiviral agents (DAAs), are being rolled out.

## 2. Hepatitis C during pregnancy

Although HCV affects a significant number of women of reproductive age, few studies have actually examined the impact of chronic HCV infection on pregnancy outcomes. A report on 506 HCV-infected pregnant women in the United States showed a higher risk for premature rupture of membranes and, in women with excessive weight gain, a greater risk of developing gestational diabetes mellitus [22]. Increased prevalence of gestational diabetes was also found in pregnant, HCV-infected women from the Hepatitis C Vertical Transmission Study Group (n=148) [23], and in a group of 555 HCV-infected women from the National Inpatient Sample [24]. Furthermore, the incidence of cholestasis of pregnancy is increased in women who are HCV antibody-positive, and this condition appears earlier during gestation compared to HCV-negative women [25,26]. A large population-based study that involved 749 HCV or hepatitis B virus (HBV)-seropositive women who delivered between 1988 and 2007 revealed significantly higher rates of preterm delivery, premature rupture of membranes, placental abruption, low birth weight, low Apgar scores at 1 min, congenital malformations, and overall perinatal mortality [27]. Increased risks for obstetric complications associated with chronic HCV infection were not observed in other studies, though these were generally limited by small sample sizes [28,29].

A series of seminal studies have shown that there is a decrease, and even normalization, of levels of serum alanine aminotransferase (ALT), a marker of liver inflammation and hepatocellular injury, during the second and third trimesters of pregnancy. Concomitant with the decrease in serum ALT, HCV viral load increases, reaching a peak during the third trimester [8,30,31]. Conversely, exacerbation of chronic hepatitis C, including significant rebound of ALT levels and significantly worsening liver histopathology (Knodell score; portal necrosis; lobular degeneration; inflammation), were reported in the post-partum period, along with a reduction in HCV plasma viral load [29,32-36]. Taken together, these observations led to the initial suggestion that pregnancy can worsen HCV-associated liver injury and that pregnancy-associated immune modulation can influence the course of HCV disease.

For decades, pregnancy in immunological terms was widely thought of as a type of allogeneic organ transplant, though one that did not lead to rejection by the maternal immune system. This conceptualization of immunology of pregnancy also led to the generalized assessment that gestation was a state of « immunologic weakness » where the pregnant woman was subjected to increased susceptibility to infectious disease [37]. During pregnancy, the maternal immune system is exposed to paternal alloantigens and establishment of maternofetal tolerance is required to sustain foetal integrity. In addition to several locally-acting mechanisms, systemic changes in the maternal immune system take place in order to facilitate tolerance of the foetus [38]. Indeed, pregnancy is associated with quantitative and qualitative modulation of maternal immunity [39,40]: immunoglobulin synthesis is increased [41] while T cell-mediated immune responses are repressed [42].

Oestrogen was shown to inactivate the intrathymic T-cell differentiation pathway in mice while at the same time activating an extrathymic differentiation pathway in the liver [43], a mechanism that was also observed to take place during normal pregnancy [44]. Regulatory T cells (Treg) were shown to play a crucial role in maternofetal tolerance, and studies in humans have demonstrated an expansion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells beginning early in gestation and reaching a peak in the second trimester [45-47]. These findings are consistent with decreased resistance to intracellular pathogens and the remission of T cell-associated autoimmune diseases such as multiple sclerosis and rheumatoid arthritis, which is commonly observed during pregnancy [48-50]. Thus, the decrease in ALT levels and increased HCV viral load observed in the third trimester of pregnancy in women chronically infected with HCV could conceivably be explained by a pregnancy-associated decline in immune-mediated hepatocellular destruction [8,30].

However, in evolutionary terms, pregnancy represents one of the most critical periods for the continued existence of a given species [reviewed in ref. n°51]. During this period, the maternal immune system is essential to protect the mother from pathogens and prevent damage to the unborn child. Pregnant mice are capable of developing antiviral memory CD8<sup>+</sup> T cell responses just like their non-pregnant littermates, and the numbers, proliferative capacity, and functional properties of these cells remain essentially intact [52,53]. We and others have shown that pregnant women infected with HCV were capable of mounting both humoral and cell-mediated immune responses directed against HCV antigens, including E2-p7-NS2-NS3 and HCV alternate reading frame protein (ARFP), and that these responses were comparable to those observed in non-pregnant subjects [54,55]. By studying the evolution of HCV quasispecies throughout pregnancy, we also obtained evidence of the presence of statistically significant selective immune pressure exerted on specific regions of the E2 envelope protein during the third trimester of pregnancy, including E2 hypervariable regions 1 and 3 (HVR1 and HVR3) [56]. The foetus is also equipped with its own developing yet already active immune system that can modulate the manner in which the mother responds to her antigenic environment [21]. Indeed, significant HIV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses are detected in uninfected children born to HIV-infected mothers [57,58], suggesting that CTL priming occurred in these subjects and that the resulting responses conferred a degree of protection against HIV infection. T cells are already detectable during gestational week 10 and mature and functional CD8<sup>+</sup> T cell responses to congenitally-acquired human cytomegalovirus (CMV) can be detected as early as 28 weeks of gestation, suggesting that the human foetal immune system is capable of effector responses [59-61]. Thus, although no HCV-specific T cell responses were observed in umbilical cord blood samples obtained from children born to HCV-infected mothers [62], and although a footprint of foetal immune responses on maternal circulating viral populations has to our knowledge never been evidenced, antiviral immune responses in pregnancy should be

considered as the sum of the responses that originate from the maternal immune system and from that of the foetus, thereby representing a unique immunologic landscape that may be modulated but is certainly not strictly suppressed [21].

Parturition, the final phase of pregnancy, is characterized by a pro-inflammatory environment that promotes uterine contractions, rejection of the placenta, and delivery of the newborn child [21]. It was shown that a state of broad immune activation develops in pregnant women at or near delivery [63]. During the course of a normal pregnancy, levels of neopterin, a blood serum marker of immune activation, rise before delivery and decline 2 months post-partum, while levels of soluble CD8 (sCD8), another marker of immune activation, increase at delivery and peak at 2 months post-partum. In addition, 6 to 8 weeks post-partum, the frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells in the peripheral circulation rapidly declines to pre-pregnancy levels [47]. Interestingly, 3 months after delivery, serum HCV RNA levels decrease and serum ALT levels increase to reach values similar to those found before pregnancy [15,30]. One can hypothesize that the loss of pregnancy-associated immune tolerance, concomitant with the pro-inflammatory environment associated with parturition, leads to a surge in maternal HCV-specific cell-mediated immune responses that results in a better control of HCV viral load. Honegger *et al.* [55] reported that the decline in HCV viral load observed between the third trimester and the post-partum period was associated with an important (100%) increase in HCV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses, as measured using IFN- $\gamma$  ELISpot and overlapping peptide panels. In addition, the breadth of the average T-cell response was also improved post-partum, targeting twice as many HCV peptide pools than during the third trimester [55]. These results are consistent with a model in which the post-partum rebound in liver inflammation and decline in HCV viral load could result from the rekindling of HCV-specific T cell responses and ensuing hepatic pathology resulting from destruction of infected hepatocellular tissue. Finally, Hattori *et al.* reported that 2 of 22 pregnant women with chronic HCV infection experienced « spontaneous » resolution of HCV viremia following parturition [64]. This rate of clearance was significantly greater than that observed in a non-pregnant control group (n=120). In addition, the HCV core protein levels at 3 months post-partum were much lower among patient who cleared HCV viremia than in those who had persistently detectable HCV RNA levels [64]. Overall, these findings testify to a remarkable degree of reconstitution of HCV-specific cell-mediated immune responses following parturition in HCV-infected women.

### **3. Transmission of HCV from mother to child**

In developed countries, MTCT is the leading cause of pediatric HCV infection. Multiple host factors were shown to increase the risk of HCV MTCT, including amniocentesis, prolonged rupture of membranes, and elevated HCV viral load in the mother. Indeed, perinatal HCV transmission is almost restricted to women with detectable HCV RNA in the

peripheral blood and MTCT rarely occurs if the maternal viral load remains below  $1 \times 10^5$  HCV RNA copies/ml plasma [10,13-16,65,66]. However, there is a broad overlap in the levels of plasma HCV RNA between transmitting and non-transmitting mothers [66].

Standard of care treatment for chronic HCV infection is a combination of pegylated interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) and ribavirin [67,68]. Recently-developed DAAs such as telaprevir and boceprevir [69,70] can be added to this backbone to enhance the rate of sustained virological response (SVR). MTCT of HIV-1 can be efficiently prevented by antiretroviral prophylaxis and programmed cesarean section [71,72]. However, in the case of hepatitis C, ribavirin is contraindicated for use in pregnancy (FDA Pregnancy Category X), as it was shown to be teratogenic in multiple animal species [73-75]. IFN- $\alpha$ , a Pregnancy Category C drug, does not appear to exert overtly adverse effects on the foetus, but clinical experience is limited [76,77]. Furthermore, use of IFN- $\alpha$  in children was associated with abnormal neurologic examinations [78]. Finally, whether programmed cesarean section is effective in preventing MTCT of HCV is unclear based on published evidence [79-83]. This has interesting implications regarding the timing and actual mechanisms that are involved in mother-to-child HCV transmission, which might take place earlier during gestation as compared with HIV-1 transmission. Indeed, the detection of HCV viral RNA in some infants in the first 3 days of life suggests that early *in utero* infection is possible [65,84]. In fact, 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, as evidenced by detectable HCV RNA levels several weeks after birth [65] and by the presence of HCV variants that are not contemporaneous with the maternal quasispecies at birth [85].

Two studies have shown that high ALT levels in the year preceding pregnancy and at delivery are associated with higher rate of MTCT, suggesting that maternal development of hepatocellular injury is a potential risk factor for HCV vertical transmission [86,87]. Moreover, HCV infection and signs of viral replication in maternal peripheral blood mononuclear cells (PBMC) increases the risk of vertical transmission [88,89]. In contrast, breastfeeding, HCV genotype and mode of delivery were not associated with MTCT of HCV [66].

Most importantly, multiple studies have shown that the rate of MTCT of HCV is increased 3-4-fold when the mother is coinfecting with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the etiologic agent of AIDS [16,79,90,91]. In a meta-analysis of 10 studies, it was shown that maternal coinfection with HCV and HIV-1 increases the odds of vertical HCV transmission by 90% compared with maternal HCV infection alone [92]. Some studies suggest that this increase occurs mainly in the context of co-transmission [93]. How HIV-1 infection enhances the rate of HCV transmission is unclear. This could result from higher HCV viral load in HIV-infected transmitters, though this was not consistently observed [8,12]. HIV-1 infection

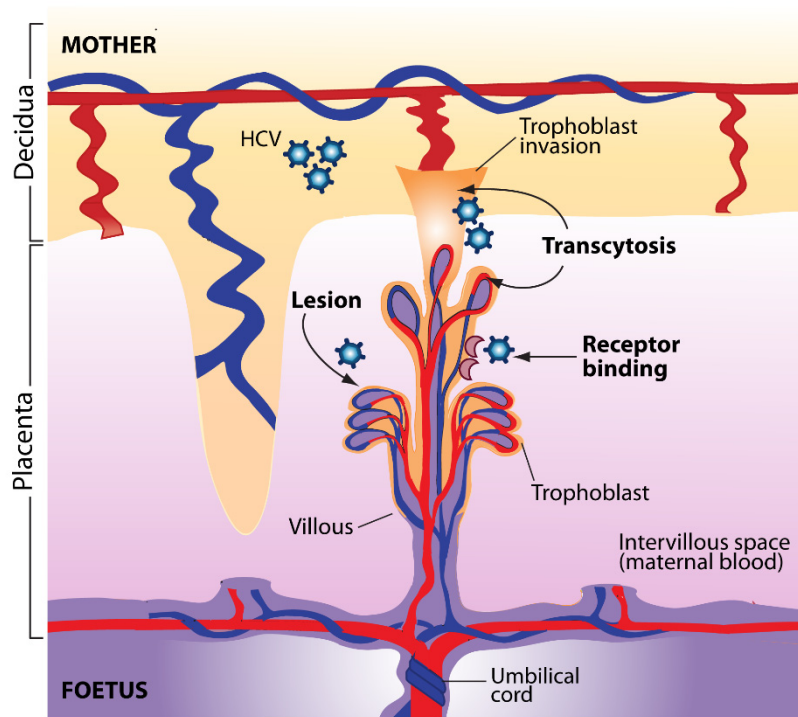
facilitates HCV entry and replication in PBMC, which constitutes a risk factor for vertical HCV transmission [88,94]. PBMC could act as a vehicle for the virus and transfer it to target cells in the new host, or produce HCV-containing exosomes that can by themselves enter the foetal bloodstream and lead to vertical transmission [89]. Another possibility is that HIV-induced immune suppression interferes with HCV-specific innate and/or humoral and/or cell-mediated immunity at the maternofetal interface. As HIV-1 infects trophoblasts [95], another possibility is that this leads to a compromise in the integrity of the placental barrier, leading to transport of HCV-infected cells and/or free virus in the foetal circulation. Alternatively, HIV-associated chorioamnionitis could also lead to the generation of placental microtransfusions through which HCV infection can be transmitted to the foetus [96] (Figure 1).

Protection from MTCT requires the coordination of multiple components of the immune response, including cell migration for surveillance and recognition [21]. The decidua, placenta and umbilical cord provide a direct connection and regulate the exchanges between the mother and the foetus: in addition to a variety of cell-free substances, foetal and maternal cells transit through the placenta in both directions. Maternal DNA can be detected in foetal lymph nodes, resulting in a maternal microchimerism [97]. Maternal cells in the foetus promote the generation of foetal Treg cells and promote foetomaternal tolerance [98]. It is suggested that HCV transmission occurs directly through the placenta, as the amniotic fluid does not show evidence of accumulation of HCV RNA [99]. The uterine decidua contains large amounts of immune cells, including macrophages, T lymphocytes and natural killer (NK) cells [21]. The placenta is also able to recognize and respond to microbial pathogens. It is made up of chorionic villi and a layer of trophoblasts (syncytiotrophoblasts and cytotrophoblasts) [100]. Syncytiotrophoblasts make up the maternofetal interface through which the exchange of substrates occurs *via* transcytosis. Infection of the placenta and of the foetus depends on the relative permissiveness of these cells to different pathogens. Placental cells produce multiple cytokines, chemokines and hormones. For instance, the production of IFN- $\beta$  and secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) by trophoblasts following TLR-3 stimulation in response to a viral infection is thought to interfere with MTCT [21]. Transmission of HBV from mother to child can occur early in pregnancy via viral transcytosis across the undifferentiated trophoblasts layer [101]. This was also shown for HIV-1 [102]. Babik *et al.* estimated that  $1 \times 10^{13}$ - $1 \times 10^{14}$  HCV virions reach the placental bed during gestation, making highly probable that some particles would cross the placenta even if transmission is inefficient [62]. Thus, foetal exposure to HCV would take place more frequently than actual *in utero* transmission, perhaps even altering the balance between suppressive and pro-inflammatory responses in the process [62]. Low levels of chronic T cell activation may be beneficial in promoting T cell function, and IFN- $\gamma$  produced in response to *in utero* exposure might play a role in the protection against viral infection, as shown in



the case of HIV-1 [103,104]. The mechanisms by which HCV can cross the placenta and the pathologic consequences of placental HCV infection are not clear at the present time. There are several potential sites in the placenta that could allow the passage of free virions or cell-associated virus [105]. Since expression many of the HCV receptors and entry cofactors have been detected in the placenta, including claudin-1, occludin, SR-B1, LDLr, and DC-SIGN, it is possible that HCV can directly infect placental cells [106-108], something that was recently demonstrated *in vitro* using human cytotrophoblasts [109] (Figure 1).

**Figure 1.** Potential pathways of HCV transmission to the foetus at the uterine-placental interface. The structural units of the placenta are the chorionic villi that float in maternal blood (intervillous space). Villi are composed of a stromal core with blood vessels, surrounded by cytotrophoblast progenitor cells. As a part of their differentiation program, extravillous cytotrophoblasts join a column at the tips of the anchoring villi and invade the uterine wall. Syncytiotrophoblasts that cover floating villi mediate exchanges of substances and passive transfer of IgG from maternal blood to the foetus. HCV transmission to the foetus could occur through viral transcytosis across trophoblast cells, could be mediated by HCV receptors expressed at the surface of placental cells, or could result from direct or indirect injury that compromise the integrity of the placental barrier.



In an elegant study, Hutardo *et al.* performed a characterization of innate immune profiles in samples of decidua, placenta, and umbilical cord blood obtained from pregnant women with chronic HCV infection and their infants, as well as healthy mother-infant pairs [110]. Their results revealed the existence of a gradient in the relative frequencies of natural killer (NK) T cells and  $\gamma\delta$  T cells, both of these cell types being more frequent in placenta than cord blood. NK T cell and  $\gamma\delta$  T cell frequencies were even higher in placenta from HCV-infected women. Production of cytokines by NK cells was robust and cytotoxicity mediated by NK T cells was also increased in HCV exposed placenta [110]. Considering that NK cells [111,112] and NK T cells [113] have been shown to play an important role in the clearance of acute HCV infection, these results provide a potential mechanism by which the placenta could prevent MTCT. Studies that analyzed the quasispecies profile based on hypervariable region 1 of the HCV E2 envelope protein gene in HCV-infected infants before seroconversion revealed a limited diversity of viral variants [114-116]. This suggests that vertical transmission of HCV may involve only a restricted number of viral variants. Moreover, it has been shown that in the context of coinfection with HCV and HIV-1, maternal HCV-specific neutralizing antibodies do not contribute to the prevention of HCV vertical transmission [117]. However, this investigation was restricted to women who were coinfecting with HIV-1, who generally have low titres of neutralizing antibodies. A recent longitudinal study of 12 HCV-infected children during their first year of life revealed the presence of neutralizing antibodies in 3 mothers, strongly suggesting that they were not sufficient for the prevention of MTCT [118].

#### **4. Pathogenesis of hepatitis C in childhood**

Considering the overall prevalence of HCV infection and the number of women of reproductive age, it has been suggested in 2001 that between 10,000 and 60,000 newborns were infected with HCV each year via vertical transmission [119]. During the first year of life, anti-HCV serologic positivity may represent passively transferred maternal antibodies, there may be intermittent detection of HCV RNA, and serum ALT may not be elevated. CDC guidelines recommend testing for anti-HCV antibodies in children born to HCV infected mothers after 12 months of age, as passively-acquired maternal antibodies will have generally waned by that time. However, if earlier testing is required, nucleic acid-based testing for HCV RNA is recommended 1 to 2 months after birth [120,121].

Comparatively little is known about the natural history of hepatitis C in children. It was shown that perinatally-acquired HCV infection becomes chronic in approximately 80% of cases [91,122-124], a rate similar to that observed in adults [125], but higher than that reported in children who were infected following transfusion with HCV-contaminated blood products [126]. If clearance occurs, it tends to take place early in infection. Younger age and normal ALT levels have been associated with spontaneous clearance in a group of 157

children with transfusion-acquired and non-transfusion-acquired hepatitis C [124]. Spontaneous clearance was also recently associated with the presence of positive IFN- $\gamma$  responses directed against structural and non-structural recombinant HCV antigens [127]. Chronic HCV infection appears to have a different clinical course in children as compared to adults. First, pediatric HCV infection is associated with minimal or mild liver disease, and advanced liver damage is not a common finding [128-130]. A broad range of ALT levels have been observed during the first year of life, with some infants exhibiting levels consistent with acute hepatitis and others showing normal or almost normal levels [114,122,129]. The association between evolution of the viral quasispecies and the clinical course of pediatric HCV infection has been examined in different studies with contrasting results. Farci *et al.* showed that the pattern of viral evolution correlated with ALT profiles but was independent of HCV viral load [114]. Biochemical evidence of hepatic injury was associated with mono- or oligoclonal populations of viral variants, whereas absence of or mild liver damage was temporally associated with the emergence of heterogeneous viral quasispecies and with the appearance of anti-HCV antibodies [114]. The authors hypothesized that heightened ALT levels may reflect the action of nascent HCV-specific cell-mediated immune responses, while normal ALT levels would result from an absence or impairment of HCV-specific cytotoxic T cells (anergy; clonal exhaustion; CTL escape) and from the presence of robust antibody responses capable of exerting strong selective pressures, leading to the diversification of the HCV variant spectrum. While results from other groups support these observations [131], other studies reported a gradual diversification of HCV quasispecies independent of serum ALT levels [115]. Protracted evolution of the variant profile was also observed in children who acquired both HCV and HIV-1 via MTCT [132,133], in HCV-infected children suffering from X-linked agammaglobulinemia [134], and in an anecdotal case of persistently seronegative, perinatally-acquired HCV infection [135]. In adults, chronic HCV infection may lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in 10 to 20 % of patients [136]. No studies have yet examined the incidence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in adults who acquired hepatitis C as a result of MTCT. Finally, treatment modalities that were initially restricted to adult subjects (*i.e.* pegIFN- $\alpha$  combined with ribavirin) are now recommended for the treatment of chronic hepatitis C in children 3-17 years of age [137-139], leading to high rates of SVR in these young patients. Therapeutic options will probably be expanding in the future. For example, the DAA boceprevir is currently in phase I clinical trial in children 3-17 years of age infected with HCV genotype 1 [140].

## 5. Conclusions

HCV infection affects a large number of women of reproductive age worldwide, and transmission of HCV from mother to child remains a serious public health problem. The pathogenesis of hepatitis C during pregnancy is in all likelihood strongly affected by

immunological changes associated with gestation and maternofetal tolerance. This leads to heightened HCV viral load in the third trimester of pregnancy, a situation which may provide the virus with improved opportunities to disseminate. The rebound of hepatocellular damage observed following parturition could be associated with a rekindling of HCV-specific cell-mediated immune responses that are attempting to bring viral replication under control. Interestingly, this period might in fact represent a strategic timeframe to initiate antiviral treatment with pegIFN- $\alpha$ , ribavirin, and DAAs, with the objective of achieving superior rates of SVR.

At the same time, in spite of the seemingly overwhelming exposure of the foetus to HCV virions, antigens, and maternal HCV-infected PBMCs, the rate of MTCT remains surprisingly modest when compared to HIV-1 or CMV. This underlines the uncanny efficacy of the restriction mechanisms that not only physically isolate the foetus from contact with HCV, but also provide innate and adaptive defences against viral infection. The characterization of the precise nature of these mechanisms should be the focus of further research, as they hold the keys to a novel understanding of host-pathogen interactions, and, potentially, to the development of new antiviral approaches.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Réseau SIDA et maladies infectieuses of le Fonds de la recherche du Québec-Santé (FRQS). A.L.C. was the recipient of a CIHR postdoctoral scholarship.

## **Conflict of Interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## **References and Notes**

1. Lavanchy, D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* **2009**, *29 (Suppl 1)*, 74-81.
2. Alter, M.J. Hepatitis C virus infection in the United States. *J. Hepatol.* **1999**, *31 (Suppl 1)*, 88-91.
3. Arshad, M.; El-Kamary, S.S.; Jhaveri, R. Hepatitis C virus infection during pregnancy and the newborn period--are they opportunities for treatment? *J. Viral. Hepat.* **2011**, *18*, 229-236.
4. Zahran, K.M.; Badary, M.S.; Agban, M.N.; Abdel Aziz, N.H. Pattern of hepatitis virus infection among pregnant women and their newborns at the Women's Health

- Center of Assiut University, Upper Egypt. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2010**, *111*, 171-174.
5. Alter, M. J. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* **1997**, *26*, 62S-65S.
  6. Thomas, D.L.; Zenilman, J.M.; Shih, J.W.; Galai, N.; Carella, A.V.; Quinn, T.C. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore-an analysis of 309 sex partnerships. *J. Infect. Dis.* **1995**, *171*, 768-775.
  7. Klevens, R.M.; Hu, D.J.; Jiles, R.; Holmberg S.D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55 Suppl 1*, S3-S9.
  8. Conte, D.; Fraquelli, M.; Prati, D.; Colucci, A.; Minola, E. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology* **2000**, *31*, 751-755.
  9. Wesjtal, R.; Widell, A.; Mansson, A.S.; Hermodsson, S.; Nokrans, G. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Ann. Intern. Med.* **1992**, *117*, 887-890.
  10. Ohto, H.; Terazawa, S.; Sasaki, N.; Hino, K.; Ishiwata, C.; Kako, M.; Ujiie, N.; Endo, C.; Matsui, A.; Okamoto, H.; Mishiro, S.; Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *330*, 744-750.
  11. Novati, R.; Thiers, V.; Monforte, A.D.; Maisonneuve, P.; Principi, N.; Conti, M.; Lazzarin, A.; Brechot, C. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus detected by nested polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **1992**, *165*, 720-723.
  12. Zanetti, A.R.; Tanzi, E.; Paccagnini, S.; Principi, N.; Pizzocolo, G.; Caccamo, M.L.; D'Amico, E.; Cambie, G.; Vecchi, L.; Lombardy Study Group on Vertical HCV Transmission. Mother-to-infant transmission of hepatitis C. Lombardy study group on vertical HCV transmission. *Lancet* **1995**, *345*, 289-291.
  13. Agha, S.; Sherif, L.S.; Allam, M.A.; Fawzy, M. Transplacental transmission of hepatitis C virus in HIV-negative mothers. *Res. Virol.* **1998**, *149*, 229-234.
  14. Matsubara, T.; Sumazaki, R.; Takita, H. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a prospective study. *Eur. J. Pediatr.* **1995**, *154*, 973-978.
  15. Lin, H.H.; Kao, J.H.; Hsu, H.Y.; Ni, Y.H.; Yeh, S.H.; Hwang, L.H.; Chang, M.H.; Hwang, S.C.; Chen, P.J.; Chen, D.S. Possible role of high-titer maternal viremia in perinatal transmission of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* **1993**, *169*, 638-641.
  16. Thomas, S.L.; Newell, M.L.; Peckham, C.S.; Ades, A.E.; Hall, A.J. 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.* **1998**, *27*, 108-117.
  17. Akhtar, S.; Moatter, T. Intra-household clustering of hepatitis C virus infection in Karachi, Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *98*, 535-539.

18. Miller, F.D.; Abu-Raddad, L.J. Evidence of intense ongoing endemic transmission of hepatitis C virus in Egypt. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **2010**, *107*, 14757-14762.
19. Schwimmer, J.B.; Balistreri, W.F. Transmission, natural history, and treatment of hepatitis C virus infection in the pediatric population. *Semin. Liver Dis.* **2000**, *20*, 37-46.
20. Jafri, W.; Jafri, N.; Yakoob, J.; Islam, M.; Tirmizi, S.F.; Jafar, T.; Akhtar, S.; Hamid, S.; Shah, H.A.; Nizami, S.Q. Hepatitis B and C: prevalence and risk factors associated with seropositivity among children in Karachi, Pakistan. *BMC Infect. Dis.* **2006**, *6*, 101.
21. Mor, G.; Cardenas, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2010**, *63*, 425-433.
22. Pergam, S.A.; Wang, C.C.; Gardella, C.M.; Sandison, T.G.; Phipps, W.T.; Hawes, S.E. Pregnancy complications associated with hepatitis C: data from a 2003-2005 Washington state birth cohort. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2008**, *199*, 38.e1-38.e9.
23. Buresi, M.C.; Lee, J.; Gill, S.; Kong, J.M.; Money, D.M.; Yoshida, E.M. Hepatitis C vertical Transmission Study Group. The prevalence of gestational diabetes mellitus and glucose abnormalities in pregnant women with hepatitis C virus infection in British Columbia. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* **2010**, *32*, 935-941.
24. Reddick, K.L.; Jhaveri, R.; Gandhi, M.; James, A.H.; Swamy, G.K. Pregnancy outcomes associated with viral hepatitis. *J. Viral. Hepat.* **2011**, *18*, e394-e398.
25. Locatelli, A.; Roncaglia, N.; Arreghini, A.; Bellini, P.; Vergani, P.; Ghidini, A. Hepatitis C virus infection is associated with a higher incidence of cholestasis of pregnancy. *BJOG*. **1999**, *106*, 498-500.
26. Paternoster, D.M.; Fabris, F.; Palu, G.; Santarossa, C.; Bracciante, R.; Snijders, D.; Floreani, A. Intra-hepatic cholestasis of pregnancy in hepatitis C virus infection. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2002**, *81*, 99-103.
27. Safir, A.; Levy, A.; Sikuler, E.; Sheiner, E. Maternal hepatitis B virus or hepatitis C virus carrier status as an independent risk factor for adverse perinatal outcome. *Liver Int.* **2010**, *30*, 765-770.
28. Floreani, A.; Paternoster, D.; Zappala, F.; Cusinato, R.; Bombi, G.; Grella, P.; Chiamonte, M. Hepatitis C virus infection in pregnancy. *BJOG*. **1996**, *103*, 325-329.
29. Jabeen, T.; Cannon, B.; Hogan, J.; Crowley, M.; Devereux, C.; Fanning, L.; Kenny-Walsh, E.; Shanahan, F.; Whelton, M.J. Pregnancy and pregnancy outcome in hepatitis C type 1b. *QJM*. **2000**, *93*, 597-601.
30. Gervais, A.; Bacq, Y.; Bernuau, J.; Martinot, M.; Auperin, A.; Boyer, N.; Kilani, A.; Erlinger, S.; Valla, D.; Marcellin, P. Decrease in serum ALT and increase in serum

- HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **2000**, *32*, 293-299.
31. Paternoster, D.M.; Santarossa, C.; Grella, P.; Palu, G.; Baldo, V.; Boccagni, P.; Floreani, A. Viral load in HCV RNA-positive pregnant women. *Am. J. Gastroenterol.* **2001**, *96*, 2751-2754.
  32. Fontaine, H.; Nalpas, B.; Carnot, F.; Brechot, C.; Pol, S. Effect of pregnancy on chronic hepatitis C: a case-control study. *Lancet* **2000**, *356*, 1328-1329.
  33. Vento, S.; Longhi, M.S.; Cainelli, F.; Concia, E. Effect of pregnancy on chronic hepatitis C. *Lancet* **2001**, *357*, 389-390.
  34. Oketani, M.; Shibatou, T.; Yamashita, K.; Arima, T.; Arima, T. Postpartum acute exacerbation of chronic hepatitis C with complete response to interferon- $\alpha$ . *J. Gastroenterol.* **2002**, *37*, 658-662.
  35. Latt, N.C.; Spencer, J.D.; Beeby, P.J.; McCaughan, G.W.; Saunders, J.B.; Collins, E.; Cossart, Y.E. Hepatitis C in injecting drug-using women during and after pregnancy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2000**, *15*, 175-181.
  36. Romero-Gómez, M.; Suárez-García, E.; Casanovas, J.; Nogales, M.C.; Vargas, J.; Otero, M.A.; Castro Fernández, M. Influencia del embarazo en la infección crónica por el virus C de la hepatitis [Influence of pregnancy in chronic hepatitis C virus infection]. *Med. Clin. (Barc)*. **1998**, *111*, 641-644.
  37. Billingham, R.E.; Brent, L.; Medawar, P.B. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* **1953**, *172*, 603-606.
  38. Munoz-Suano, A.; Hamilton, A.B.; Betz, A.G. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol. Rev.* **2011**, *241*, 20-38.
  39. Lichtenstein, M.R. Tuberculin reaction in tuberculosis during pregnancy. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* **1942**, *48*, 89-93.
  40. Raghupathy, R.; Raghupathy, R.; Makhseed, M.; Azizieh, F.; Omu, A.; Gupta, M.; Farhat, R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.* **2000**, *15*, 713-718.
  41. Narita, M.; Yamada, S.; Kikuta, H.; Togashi, T. Reconstitution of humoral immunity during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2000**, *44*, 148-152.
  42. Watanabe, M.; Iwatani, Y.; Kaneda, T.; Hidaka, Y.; Mitsuda, N.; Morimoto, Y.; Amino, N. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **1997**, *37*, 368-377.
  43. Okuyama, R.; Abo, T.; Seki, S.; Ohteki, T.; Sugiura, K.; Kusumi, A.; Kumagai, K. Estrogen administration activates extrathymic T cell differentiation in the liver. *J. Exp. Med.* **1992**, *175*, 661-669.

44. Kimura, M.; Hanawa, H.; Watanabe, H.; Ogawa, M.; Abo, T. Synchronous expansion of intermediate TCR cells in the liver and uterus during pregnancy. *Cell. Immunol.* **1995**, *162*, 16-25.
45. Aluvihare, V.R.; Kallikourdis, M.; Betz, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 266-271.
46. Heikkinen, J.; Mottonen, M.; Alanen, A.; Lassila, O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin. Exp. Immunol.* **2004**, *136*, 373-378.
47. Somerset, D.A.; Zheng, Y.; Kilby, M.D.; Sansom, D.M.; Drayson, M.T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell subset. *Immunology* **2004**, *112*, 38-43.
48. Rogerson, S.J.; Hviid, L.; Duffy, P.E.; Leke, R.F.; Taylor, D.W. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect. Dis.* **2007**, *7*, 105-117.
49. Da Silva, J.A.P.; Spector, T.D. The role of pregnancy in the course and etiology of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **1992**, *11*, 189-194.
50. Soldan, S.S.; Alvarez Retuerto, A.I.; Sicotte, N.L.; Voskuhi, R.R. Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estradiol. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 6267-6274.
51. Nahmias, A.J.; Schollin, J.; Abramowsky, C. Evolutionary-developmental perspectives on immune system interactions among the pregnant woman, placenta, and fetus, and responses to sexually transmitted infectious agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1230*, 25-47.
52. Constantin, C.M.; Masopust, D.; Gourley, T.; Grayson, J.; Strickland, O.L.; Ahmed, R.; Bonney, E.A. Normal establishment of virus-specific memory CD8 T cell pool following primary infection during pregnancy. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4383-4389.
53. Norton, M.T.; Fortner, K.A.; Oppenheimer, K.H.; Bonney, E.A. Evidence that CD8 T-cell homeostasis and function remain intact during murine pregnancy. *Immunology* **2010**, *131*, 426-437.
54. Troesch, M.; Jalbert, E.; Canobio, S.; Boulassel, M.R.; Routy, J.P.; Bernard, N.F.; Bruneau, J.; Lapointe, N.; Boucher, M.; Soudeyins, H. Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* **2005**, *19*, 775-784.
55. Honegger, J.; Prasad, M.; Walker, C. Post-partum surge in T-cell immunity to the hepatitis C virus. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, October 29<sup>th</sup>-November 1<sup>st</sup>, **2009**. Abstract n°810.
56. Troesch, M.; Meunier, I.; Lapierre, P.; Lapointe, N.; Alvarez, F.; Boucher, M.; Soudeyins, H. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* **2006**, *352*, 357-367.



57. Cheynier, R.; Langlade-Demoyen, P.; Marescot, M.R.; Blanche, S.; Blondin, G.; Wain-Hobson, S.; Griscelli, C.; Vilmer, E.; Plata, F. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur. J. Immunol.* **1992**, *22*, 2211-2217.
58. Rowland-Jones, S.; Nixon, D.F.; Aldhous, M.C.; Gotch, F.; Ariyoshi, K.; Hallam, N.; Kroll, J.S.; Froebel, K.; McMichael, A. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* **1993**, *341*, 860-861.
59. Dauby, N.; Goetghebuer, T.; Kollmann, T.R.; Levy, J.; Marchant, A. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *Lancet Infect. Dis.* **2012**, *12*, 330-340.
60. Haynes, B.F.; Heinly, C.S. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 1445-1458.
61. Marchant, A.; Appay, V.; Van Der Sande, M.; Dulphy, N.; Liesnard, C.; Kidd, M.; Kaye, S.; Ojuola, O.; Gillespie, G.M.; Vargas Cuero, A.L.; Cerundolo, V.; Callan, M.; McAdam, K.P.; Rowland-Jones, S.L.; Donner, C.; McMichael, A.J.; Whittle, H. Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 1747-1755.
62. Babik, J.M.; Cohan, D.; Monto, A.; Hartigan-O'Connor, D.J.; McCune, J.M. The human fetal immune response to hepatitis C virus exposure in utero. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 196-206.
63. Burns, D.N.; Nourjah, P.; Wright, D.J.; Minkoff, H.; Landesman, S.; Rubinstein, A.; Goedert, J.J.; Nugent, R.P. Changes in immune activation markers during pregnancy and postpartum. *J. Reprod. Immunol.* **1999**, *42*, 147-165.
64. Hattori, Y.; Orito, E.; Ohno, T.; Sugauchi, F.; Suzuki, S.; Sugiura, M.; Suzumori, K.; Hattori, K.; Ueda, R.; Mizokami, M. Loss of hepatitis C virus RNA after parturition in female patients with chronic HCV infection. *J. Med. Virol.* **2003**, *71*, 205-211.
65. Resti, M.; Azzari, C.; Mannelli, F.; Moriondo, M.; Novembre, E.; de Martino, M.; Vierucci, A. 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*, 437-441.
66. Indolfi, G.; Resti, M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J. Med. Virol.* **2009**, *81*, 836-843.
67. Manns, M.P.; McHutchison, J.G.; Gordon, S.C.; Rustgi, V.K.; Shiffman, M.; Reindollar, R.; Goodman, Z.D.; Koury, K.; Ling, M.; Albrecht, J.K. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **2001**, *358*, 958-965.

68. Fried, M.W.; Shiffman, M.L.; Reddy, K.R.; Smith, C.; Marinos, G.; Goncales, F.L.; Haussinger, D.; Diago, M.; Carosi, G.; Dhumeaux, D.; Craxi, A.; Lin, A.; Hoffman, J.; Yu, J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 975-982.
69. McHutchison, J.G.; Manns, M.P.; Muir, A.J.; Terrault, N.A.; Jacobson, I.M.; Afdhal, N.H.; Heathcote, E.J.; Zeuzem, S.; Reesink, H.W.; Garg, J.; Bsharat, M.; George, S.; Kauffman, R.S.; Adda, N.; Di Bisceglie, A.M.; PROVE3 Study Team. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 1292-1303.
70. Poordad, F.; McCone, J.; Bacon, B.R.; Bruno, S.; Manns, M.P.; Sulkowski, M.S.; Jacobson, I.M.; Reddy, K.R.; Goodman, Z.D.; Boparai, N.; DiNubile, M.J.; Sniukiene, V.; Brass, C.A.; Albrecht, J.K.; Bronowicki, J.P.; SPRINT-2 Investigators. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1195-1206.
71. Connor, E.M.; Sperling, R.S.; Gelber, R.; Kiselev, P.; Scott, G.; O'Sullivan, M.J.; VanDyke, R.; Bey, M.; Shearer, W.; Jacobson, R.L.; Jimenez, E.; O'Neill, E.; Bazin, B.; Delfraissy, J.F.; Culnane, M.; Coombs, R.; Elkins, M.; Moye, J.; Stratton, P.; Balsley, J.; Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 1173-1180.
72. Townsend, C.L.; Cortina-Borja, M.; Peckham, C.S.; de Ruiter, A.; Lyall, H.; Tookey, P.A. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006. *AIDS* **2008**, *22*, 973-981.
73. Ferm, V.H.; Willhite, C.; Kilham, L. Teratogenic effects of ribavirin on hamster and rat embryos. *Teratology* **1978**, *17*, 93-101.
74. Kilham, L.; Ferm, V.H. Congenital anomalies induced in hamster embryos with ribavirin. *Science* **1977**, *195*, 413-414.
75. Roberts, S.S.; Miller, R.K.; Jones, J.K.; Lindsay, K.L.; Greene, M.F.; Maddrey, W.C.; Williams, I.T.; Liu, J.; Spiegel, R.J. The Ribavirin Pregnancy Registry: Findings after 5 years of enrollment, 2003-2009. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* **2010**, *88*, 551-559.
76. Trotter, J.F.; Zygmunt, A.J. Conception and pregnancy during interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *J. Clin. Gastroenterol.* **2001**, *32*, 76-78.
77. Labarga, P.; Pinilla, J.; Cachorro, I.; Ruiz, Y. 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.* **2007**, *24*, 414-416.

78. Dubois, J.; Hershon, L.; Carmant, L.; Belanger, S.; Leclerc, J.M.; David, M. Toxicity profile of interferon alfa-2b in children: A prospective evaluation. *J. Pediatr.* **1999**, *135*, 782-785.
79. Marine-Barjoan, E.; Berrebi, A.; Giordanengo, V.; Favre, S.F.; Haas, H.; Moreigne, M.; Izopet, J.; Tricoire, J.; Tran, A.; Pradier, C.; Bongain, A. HCV/HIV co-infection, HCV viral load and mode of delivery: risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus? *AIDS* **2007**, *21*, 1811-1815.
80. Gibb, D.M.; Goodall, R.L.; Dunn, D.T.; Healy, M.; Neave, P.; Cafferkey, M.; Butler, K. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* **2000**, *356*, 904-907.
81. European Paediatric Hepatitis C Virus Network. A significant sex--but not elective cesarean section--effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1872-1879.
82. Ghamar Chehreh, M.E.; Tabatabaei, S.V.; Khazanehdari, S.; Alavian, S.M. 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.* **2011**, *283*, 255-260.
83. Arshad, M.; El-Kamary, S.S.; Jhaveri, R. Hepatitis C virus infection during pregnancy and the newborn period--are they opportunities for treatment? *J. Viral. Hepat.* **2011**, *18*, 229-236.
84. Mok, J.; Pembrey, L.; Tovo, P.A.; Newell, M.L.; European Paediatric Hepatitis C Virus Network. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? *Arch. Dis. Child.* **2005**, *90*, F156-F160.
85. Pollack, H.; Hou, Z.; Hughes, A.L.; Borkowsky, W. Perinatal transmission and viral evolution of hepatitis C virus quasispecies in infants coinfecting with HIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2004**, *36*, 890-899.
86. Hayashida, A.; Inaba, N.; Oshima, K.; Nishikawa, M.; Shoda, A.; Hayashida, S.; Negishi, M.; Inaba, F.; Inaba, M.; Fukasawa, I.; Watanabe, H.; Takamizawa, H. Re-evaluation of the true rate of hepatitis C virus mother-to-child transmission and its novel risk factors based on our two prospective studies. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2007**, *33*, 417-422.
87. Indolfi, G.; Azzari, C.; Moriondo, M.; Lippi, F.; de Martino, M.; Resti, M. Alanine transaminase levels in the year before pregnancy predict the risk of hepatitis C virus vertical transmission. *J. Med. Virol.* **2006**, *78*, 911-914.
88. Azzari, C.; Resti, M.; Moriondo, M.; Ferrari, R.; Lionetti, P.; Vierucci, A. Vertical transmission of HCV is related to maternal peripheral blood mononuclear cell infection. *Blood* **2000**, *96*, 2045-2048.
89. Azzari, C.; Moriondo, M.; Indolfi, G.; Betti, L.; Gambineri, E.; de Martino, M.; Resti, M. Higher risk of hepatitis C virus perinatal transmission from drug user mothers is

- mediated by peripheral blood mononuclear cell infection. *J. Med. Virol.* **2008**, *80*, 65-71.
90. Tovo, P.A.; Palomba, E.; Ferraris, G.; Principi, N.; Ruga, E.; Dallacasa, P.; Maccabruni, A. 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. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *25*, 1121-1124.
  91. Mast, E.E.; Hwang, L.Y.; Seto, D.S.; Nolte, F.S.; Nainan, O.V.; Wurtzel, H.; Alter, M.J. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1880-1889.
  92. Polis, C.B.; Shah, S.N.; Johnson, K.E.; Gupta, A. Impact of maternal HIV coinfection on the vertical transmission of hepatitis C virus: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *44*, 1123-1131.
  93. Papaevangelou, V.; Pollack, H.; Rochford, G.; Kokka, R.; Hou, Z.; Chernoff, D.; Hanna, B.; Krasinski, K.; Borkowsky, W. Increased transmission of vertical hepatitis C virus (HCV) infection to human immunodeficiency virus (HIV)-infected infants of HIV- and HCV-coinfecting women. *J. Infect. Dis.* **1998**, *178*, 1047-1052.
  94. Blackard, J.T.; Smeaton, L.; Hiasa, Y.; Horiike, N.; Onji, M.; Jamieson, D.J.; Rodriguez, I.; Mayer, K.H.; Chung, R.T. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfecting persons. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 258-265.
  95. Vidricaire, G.; Gauthier, S.; Tremblay, M.J. HIV-1 infection of trophoblasts is independent of gp120/CD4 Interactions but relies on heparan sulfate proteoglycans. *J. Infect. Dis.* **2007**, *195*, 1461-1471.
  96. Kwiek, J.J.; Mwapasa, V.; Milner, D.A. Jr; Alker, A.P.; Miller, W.C.; Tadesse, E.; Molyneux, M.E.; Rogerson, S.J.; Meshnick, S.R. Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e10.
  97. Gammill, H.S.; Nelson, J.L. Naturally acquired microchimerism. *Int. J. Dev. Biol.* **2010**, *54*, 531-543.
  98. Mold, J.E.; Michaelsson, J.; Burt, T.D.; Muench, M.O.; Beckerman, K.P.; Busch, M.P.; Lee, T.H.; Nixon, D.F.; McCune, J.M. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* **2008**, *322*, 1562-1565.
  99. Delamare, C.; Carbonne, B.; Heim, N.; Berkane, N.; Petit, J.C.; Uzan, S.; Grange, J.D. Detection of hepatitis C virus RNA (HCV RNA) in amniotic fluid: a prospective study. *J. Hepatol.* **1999**, *31*, 416-420.
  100. Pereira, L.; Maidji, E.; McDonagh, S.; Tabata, T. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 164-174.

101. Bhat, P.; Anderson, D.A. Hepatitis B virus translocates across a trophoblastic barrier. *J. Virol.* **2007**, *81*, 7200-7207.
102. Lagaye, S.; Derrien, M.; Menu, E.; Coïto, C.; Tresoldi, E.; Mauclère, P.; Scarlatti, G.; Chaouat, G.; Barré-Sinoussi, F.; Bomsel, M.; European Network for the Study of In Utero Transmission of HIV-1. 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. *J. Virol.* 2001, *75*, 4780-4791.
103. Hygino, J.; Lima, P.G.; Filho, R.G.; Silva, A.A.; Saramago, C.S.; Andrade, R.M.; Andrade, D.M.; Andrade, A.F.; Brindeiro, R.; Tanuri, A.; Bento, C.A. Altered immunological reactivity in HIV-1-exposed uninfected neonates. *Clin. Immunol.* **2008**, *127*, 340-347.
104. Kuhn, L.; Coutoudis, A.; Moodley, D.; Mngqundaniso, N.; Trabattoni, D.; Shearer, G.M.; Clerici, M.; Coovadia, H.M. Interferon-gamma and interleukin-10 production among HIV-1-infected and uninfected infants of HIV-1-infected mothers. *Ped. Res.* **2001**, *50*, 412-416.
105. McDonagh, S.; Maidji, E.; Ma, W.; Chang, H.T.; Fisher, S.; Pereira, L. Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 826-834.
106. Dye, J.F.; Jablenska, R.; Donnelly, J.L.; Lawrence, L.; Leach, L.; Clark, P.; Firth, J.A. Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta* **2001**, *22*, 32-43.
107. Ethier-Chiasson, M.; Duchesne, A.; Forest, J.C.; Giguere, Y.; Masse, A.; Mounier, C.; Lafond, J. Influence of maternal lipid profile on placental protein expression of LDLr and SR-BI. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2007**, *359*, 8-14.
108. Soilleux, E.J.; Barten, R.; Trowsdale, J. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 2937-2942.
109. Nie, Q.H.; Gao, L.H.; Cheng, Y.Q.; Huang, X.F.; Zhang, Y.F.; Luo, X.D.; Wang, J.Q.; Wang, Y.Y. Hepatitis C virus infection of human cytotrophoblasts cultured in vitro. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 1586-1592.
110. Hurtado, C.W.; Golden-Mason, L.; Brocato, M.; Krull, M.; Narkewicz, M.R.; Rosen, H.R. Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C-seropositive mother-infant dyads. *PloS One* **2010**, *5*, e12232.
111. Pelletier, S.; Drouin, C.; Bédard, N.; Khakoo, S.I.; Bruneau, J.; Shoukry, N.H. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J. Hepatol.* **2010**, *53*, 805-816.
112. Alter, G.; Jost, S.; Rihn, S.; Reyor, L.L.; Nolan, B.E.; Ghebremichael, M.; Bosch, R.; Altfeld, M.; Lauer, G.M. Reduced frequencies of NKp30<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup>, and NKG2D<sup>+</sup> NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol.* **2011**, *55*, 278-288.

113. Durante-Mangoni, E.; Wang, R.; Shaulov, A.; He, Q.; Nasser, I.; Afdhal, N.; Koziel, M.J.; Exley, M.A. Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive T cells. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 2159-2166.
114. Farci, P.; Quinti, I.; Farci, S.; Alter, H.J.; Strazzera, R.; Palomba, E.; Coiana, A.; Cao, D.; Casadei, A.M.; Ledda, R.; Iorio, R.; Vegnente, A.; Diaz, G.; Tovo, P.A. Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **2006**, *103*, 8475-8480.
115. Gerotto, M.; Resti, M.; Dal Pero, F.; Migliorato, I.; Alberti, A.; Bortolotti, F. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in children with chronic hepatitis C. *Infection* **2006**, *34*, 62-65.
116. Manzin, A.; Solforosi, L.; Debiaggi, M.; Zara, F.; Tanzi, E.; Romano, L.; Zanetti, A.R.; Clementi, M. Dominant role of host selective pressure in driving hepatitis C virus evolution in perinatal infection. *J. Virol.* **2000**, *74*, 4327-4334.
117. Dowd, K.A.; Hershov, R.C.; Yawetz, S.; Larussa, P.; Diaz, C.; Landesman, S.H.; Paul, M.E.; Read, J.S.; Lu, M.; Thomas, D.L.; Netski, D.M.; Ray, S.C. Maternal neutralizing antibody and transmission of hepatitis C virus to infants. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 1651-1655.
118. Meunier, J.C.; Bukh, J.; Diaz, G.; Tovo, P.A.; Casadei, A.M.; Quinti, I.; Iorio, R.; Emerson, S.; Purcell, R.H.; Farci, P. Neutralizing antibodies to hepatitis C virus in perinatally infected children followed up prospectively. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 1741-1745.
119. Yeung, L.T.; King, S.M.; Roberts, E.A. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* **2001**, *34*, 223-229.
120. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. *MMWR* **1998**, *47*, No. RR-19.
121. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. *MMWR* **2012**, *61*, No. RR-4.
122. Resti, M.; Jara, P.; Hierro, L.; Azzari, C.; Giacchino, R.; Zuin, G.; Zancan, L.; Pedditzi, S.; Bortolotti, F. Clinical features and progression of perinatally acquired hepatitis C virus infection. *J. Med. Virol.* **2003**, *70*, 373-377.
123. Tovo, P.A.; Pembrey, L.J.; Newell, M.L. Persistence rate and progression of vertically acquired hepatitis C infection. European Paediatric Hepatitis C Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 419-424.
124. Yeung, L.T.; To, T.; King, S.M.; Roberts, E.A. Spontaneous clearance of childhood hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat.* **2007**, *14*, 797-805.

125. Alter, H.J.; Seeff, L.B. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin. Liv. Dis.* **2000**, *20*, 17-35.
126. Vogt, M.; Lang, T.; Frosner, G.; Klingler, C.; Sendl, A.F.; Zeller, A.; Wiebecke, B.; Langer, B.; Meisner, H.; Hess, J. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *New Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 866-870.
127. El-Kamary, S.S.; Hashem, M.; Saleh, D.A.; Abdelwahab, S.F.; Sobhy, M.; Shebl, F.M.; Shardell, M.D.; Strickland, G.T.; Shata, M.T. Hepatitis C virus-specific cell-mediated immune responses in children born to mothers infected with hepatitis C virus. *J. Pediatr.* **2012**, in press.
128. European Paediatric Hepatitis C Virus Network. Three broad modalities in the natural history of vertically acquired hepatitis C virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41*, 45-51.
129. Jonas, M.M. Children with hepatitis C. *Hepatology* **2002**, *36*, S173-178.
130. Palomba, E.; Manzini, P.; Fiammengo, P.; Maderni, P.; Saracco, G.; Tovo, P.A. Natural history of perinatal hepatitis C virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **1996**, *23*, 47-50.
131. Gismondi, M.I.; Becker, P.D.; Diaz Carrasco, J.M.; Guzman, C.A.; Campos, R.H.; Preciado, M.V. Evolution of hepatitis C virus hypervariable region 1 in immunocompetent children born to HCV-infected mothers. *J. Viral Hepat.* **2009**, *16*, 332-339.
132. Canobio, S.; Guilbert, C.; Troesch, M.; Samson, J.; Lemay, M.; Pelletier, V.A.; Bernard-Bonnin, A.C.; Kozielski, R.; Lapointe, N.; Martin, S.R.; Soudeyins, H. 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.* **2004**, *42*, 4365-4369.
133. Quesnel-Vallières, M.; Lemay, M.; Lapointe, N.; Martin, S.R.; Soudeyins, H. HCV quasispecies evolution during treatment with interferon alfa-2b and ribavirin in two children coinfecting with HCV and HIV-1. *J. Clin. Virol.* **2008**, *43*, 236-240.
134. Gaud, U.; Langer, B.; Petropoulou, T.; Thomas, H.C.; Karayiannis, P. Changes in hypervariable region 1 of the envelope 2 glycoprotein of hepatitis C virus in children and adults with humoral immune defects. *J. Med. Virol.* **2003**, *69*, 350-356.
135. Larouche, A.; Gaëtan, G.; El-Bilali, N.; Quesnel-Vallières, M.; Martin, S.R.; Alvarez, F.; Shoukry, N.H.; Soudeyins, H. A case of seronegative HCV infection in a child infected via mother-to-child transmission. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2515-2519.
136. Castello, G.; Scala, S.; Palmieri, G.; Curley, S.A.; Izzo, F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clin. Immunol.* **2010**, *134*, 237-250.

137. Wirth, S.; Ribes-Koninckx, C.; Calzado, M.A.; Bortolotti, F.; Zancan, L.; Jara, P.; Shelton, M.; Kerkar, N.; Galoppo, M.; Pedreira, A.; Rodriguez-Baez, N.; Ciocca, M.; Lachaux, A.; Lacaille, F.; Lang, T.; Kullmer, U.; Huber, W.D.; Gonzalez, T.; Pollack, H.; Alonso, E.; Broue, P.; Ramakrishna, J.; Neigut, D.; Valle-Segarra, A.D.; Hunter, B.; Goodman, Z.; Xu, C.R.; Zheng, H.; Noviello, S.; Sniukiene, V.; Brass, C.; Albrecht, J.K. High sustained virologic response rates in children with chronic hepatitis C receiving peginterferon alfa-2b plus ribavirin. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 501-507.
138. Schwarz, K.B.; Gonzalez-Peralta, R.P.; Murray, K.F.; Molleston, J.P.; Haber, B.A.; Jonas, M.M.; Rosenthal, P.; Mohan, P.; Balistreri, W.F.; Narkewicz, M.R.; Smith, L.; Lobritto, S.J.; Rossi, S.; Valsamakis, A.; Goodman, Z.; Robuck, P.R.; Barton, B.A.; Peds-C Clinical Research Network. The combination of ribavirin and peginterferon is superior to peginterferon and placebo for children and adolescents with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 450-458.
139. Mack, C.L.; Gonzalez-Peralta, R.P.; Gupta, N.; Leung, D.; Narkewicz, M.R.; Roberts, E.A.; Rosenthal, P.; Schwarz, K.B.; North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. NASPGHAN practice guidelines: Diagnosis and management of hepatitis C infection in infants, children, and adolescents. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2012**, *54*, 838-855.
140. Pharmacokinetics of Boceprevir in Pediatric Subjects With Chronic Hepatitis C Genotype 1 (SCH503034-P07614 AM4).  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01425190>; accessed 09-29-2012.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).





## Bibliographie

1. Community Blood Center. History of Blood Banking [Available from: <http://givingblood.org/about-blood/history-of-blood-banking.aspx>.
2. Maccallum FO. Transmission of Arsenotherapy Jaundice by Blood: Failure with Faeces and Nasopharyngeal Washings. *The Lancet*. 1945;245(6342):342.
3. Maccallum FO, Bauer DJ. Homologous Serum Jaundice Transmission Experiments with Human Volunteers. *The Lancet*. 1944;243(6298):622-7.
4. Maccallum FO, Bradley WH. Transmission of Infective Hepatitis to Human Volunteers. *The Lancet*. 1944;244(6311):228.
5. Blumberg BS, Alter HJ. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA*. 1965;191(7):541-6.
6. Alter HJ, Blumberg BS. Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia antigen). *Blood*. 1966;27(3):297-309.
7. Sutnick AI, London W, Gerstley BS, Cronlund MM, Blumberg BS. Anicteric hepatitis associated with australia antigen: Occurrence in patients with down's syndrome. *JAMA*. 1968;205(10):670-4.
8. Blumberg BS, Sutnick AI, London W. Australia antigen and hepatitis. *JAMA*. 1969;207(10):1895-6.
9. Blumberg BS, Sutnick AI, London WT. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. *Bulletin of the New York Academy of Medicine: Journal of Urban Health*. 1968;44(12):1566-86.
10. Block TM, Alter HJ, London WT, Bray M. A historical perspective on the discovery and elucidation of the hepatitis B virus. *Antiviral Res*. 2016;131:109-23.
11. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: Detection by Immune Electron Microscopy of a Viruslike Antigen Associated with Acute Illness. *Science*. 1973;182(4116):1026.
12. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359.
13. Hepatitis C: World Health Organization; 2016 [updated April 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
14. 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.
15. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S45-57.
16. Mohamed AA, Elbedewy TA, El-Serafy M, El-Toukhy N, Ahmed W, Ali El Din Z. Hepatitis C virus: A global view. *World J Hepatol*. 2015;7(26):2676-80.
17. Collaborators GBoDMaCoD. Global, regional and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a

systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;385(9963):117-71.

18. Blach S, Zeuzem S, Manns M, Altraif I, Duberg A-S, Muljono DH, et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2016;2(3):161-76.

19. Arshad M, El-Kamary SS, Jhaveri R. Hepatitis C virus infection during pregnancy and the newborn period – are they opportunities for treatment? *Journal of viral hepatitis*. 2011;18(4):229-36.

20. Giangrande PLF. The history of blood transfusion. *British Journal of Haematology*. 2000;110(4):758-67.

21. Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *J Hepatol*. 2006;45(4):607-16.

22. Thursz M, Fontanet A. HCV transmission in industrialized countries and resource-constrained areas. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(1):28-35.

23. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*. 2005;5(9):558-67.

24. Tohme RA, Holmberg SD. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? *Hepatology*. 2010;52(4):1497-505.

25. 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.

26. Meisel H, Reip A, Faltus B, Krüger DH, Porst H, Wiese M, et al. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *The Lancet*. 1995;345(8959):1209-11.

27. Tohme RA, Holmberg SD. Transmission of hepatitis C virus infection through tattooing and piercing: a critical review. *Clin Infect Dis*. 2012;54(8):1167-78.

28. Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology*. 2001;33(2):321-7.

29. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(9):553-62.

30. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S58-68.

31. Glynn SA, Wright DJ, Kleinman SH, Hirschhorn D, Tu Y, Heldebrant C, et al. Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion*. 2005;45(6):994-1002.

32. Park SH, Rehmann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*. 2014;40(1):13-24.

33. Sung PS, Racanelli V, Shin E-C. CD8(+) T-Cell Responses in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:266.

34. Micaleff JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *Journal of Viral Hepatitis*. 2006;13(1):34-41.

35. Kong F, Pan Y, Chi X, Wang X, Chen L, Lv J, et al. Factors associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus in Chinese population. *Biomed Res Int*. 2014;2014:527030.

36. Larrubia JR, Moreno-Cubero E, Lokhande MU, Garcia-Garzon S, Lazaro A, Miquel J, et al. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(13):3418-30.

37. Piasecki BA, Lewis JD, Reddy KR, Bellamy SL, Porter SB, Weinrieb RM, et al. Influence of alcohol use, race, and viral coinfections on spontaneous HCV clearance in a US veteran population. *Hepatology*. 2004;40(4):892-9.
38. Grebely J, Raffa JD, Lai C, Krajden M, Conway B, Tyndall MW. Factors associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus among illicit drug users. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007;21(7):447-51.
39. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461(7265):798-801.
40. Abdel-Hakeem MS, Bédard N, Murphy D, Bruneau J, Shoukry NH. Signatures of Protective Memory Immune Responses During HCV Reinfection. *Gastroenterology*. 2014;147(4):870-81.e8.
41. Abdel-Hakeem MS, Boisvert M, Bruneau J, Soudeyns H, Shoukry NH. Selective expansion of high functional avidity memory CD8 T cell clonotypes during hepatitis C virus reinfection and clearance. *PLoS Pathogens*. 2017;13(2):e1006191.
42. Semmo N, Lucas M, Krashias G, Lauer G, Chapel H, Klenerman P. Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood*. 2006;107(11):4570.
43. Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Bartosch B, Cosset F-L, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(14):6025-30.
44. Dowd KA, Netski DM, Wang XH, Cox AL, Ray SC. Selection pressure from neutralizing antibodies drives sequence evolution during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2377-86.
45. Osburn WO, Snider AE, Wells BL, Latanich R, Bailey JR, Thomas DL, et al. Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology*. 2014;59(6):2140-51.
46. Zibert A, Meisel H, Kraas W, Schulz A, Jung G, Roggendorf M. Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology*. 1997;25(5):1245-9.
47. Ray SC, Wang Y-M, Laeyendecker O, Ticehurst JR, Villano SA, Thomas DL. Acute Hepatitis C Virus Structural Gene Sequences as Predictors of Persistent Viremia: Hypervariable Region 1 as a Decoy. *Journal of Virology*. 1999;73(4):2938-46.
48. 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.
49. Liu L, Fisher BE, Thomas DL, Cox AL, Ray SC. Spontaneous clearance of primary acute hepatitis C virus infection correlated with high initial viral RNA level and rapid HVR1 evolution. *Hepatology*. 2012;55(6):1684-91.
50. Harris HE, Eldridge KP, Harbour S, Alexander G, Teo CG, Ramsay ME, et al. Does the clinical outcome of hepatitis C infection vary with the infecting hepatitis C virus type? *J Viral Hepat*. 2007;14(3):213-20.
51. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Bureau C, Sandre K, et al. Study of host- and virus-related factors associated with spontaneous hepatitis C virus clearance. *Tissue Antigens*. 2000;56(2):154-8.
52. Inoue G, Horiike N, Michitaka K, Onji M. Hepatitis C virus clearance is prominent in women in an endemic area. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000;15(9):1054-8.

53. Durand F, Francoz C. The future of liver transplantation for viral hepatitis. *Liver International*. 2017;37:130-5.
54. Zampino R, Marrone A, Restivo L, Guerrera B, Sellitto A, Rinaldi L, et al. Chronic HCV infection and inflammation: Clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J Hepatol*. 2013;5(10):528-40.
55. Penna A, Pilli M, Zerbini A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2007;45(3):588-601.
56. Chang KM, Rehermann B, McHutchison JG, Pasquinelli C, Southwood S, Sette A, et al. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(9):2376-85.
57. Timm J, Li B, Daniels MG, Bhattacharya T, Reyor LL, Allgaier R, et al. Human leukocyte antigen-associated sequence polymorphisms in hepatitis C virus reveal reproducible immune responses and constraints on viral evolution. *Hepatology*. 2007;46(2):339-49.
58. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang K-M. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology*. 2003;38(6):1437-48.
59. Alatrakchi N, Graham CS, van der Vliet HJ, Sherman KE, Exley MA, Koziel MJ. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. *J Virol*. 2007;81(11):5882-92.
60. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology*. 2007;132(2):667-78.
61. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(23):9505-10.
62. 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.
63. Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol*. 2013;19(1):17-25.
64. Romero-Brey I, Bartenschlager R. Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses*. 2014;6(7):2826-57.
65. Shi ST, Lai MMC. HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication. In: Tan S, editor. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norflok (UK): Horizon Bioscience; 2006.
66. Fernandez-Ponce C, Dominguez-Villar M, Munoz-Miranda JP, Arbulo-Echevarria MM, Litran R, Aguado E, et al. Immune modulation by the hepatitis C virus core protein. *J Viral Hepat*. 2017.
67. Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22 Suppl 1:S108-11.
68. Falson P, Bartosch B, Alsaleh K, Tews BA, Loquet A, Ciczora Y, et al. Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 Forms Trimers at the Surface of the Virion. *J Virol*. 2015;89(20):10333-46.
69. Vieyres G, Dubuisson J, Pietschmann T. Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. *Viruses*. 2014;6(3):1149-87.

70. Drummer HE. Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies. *Front Microbiol.* 2014;5:329.
71. Douam F, Dao Thi VL, Maurin G, Fresquet J, Mompelat D, Zeisel MB, et al. Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology.* 2014;59(3):776-88.
72. Freedman H, Logan MR, Law JL, Houghton M. Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infect Dis.* 2016;2(11):749-62.
73. Vieyres G, Dubuisson J, Patel AH. Characterization of antibody-mediated neutralization directed against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 3):494-506.
74. McCaffrey K, Boo I, Poubourios P, Drummer HE. Expression and characterization of a minimal hepatitis C virus glycoprotein E2 core domain that retains CD81 binding. *J Virol.* 2007;81(17):9584-90.
75. Kong L, Giang E, Nieuwsma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, et al. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science.* 2013;342(6162):1090-4.
76. 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.
77. Torres-Puente M, Cuevas JM, Jimenez-Hernandez N, Bracho MA, Garcia-Robles I, Wrobel B, et al. Using evolutionary tools to refine the new hypervariable region 3 within the envelope 2 protein of hepatitis C virus. *Infect Genet Evol.* 2008;8(1):74-82.
78. Douam F, Lavillette D, Cosset F-L. Chapter Three - The Mechanism of HCV Entry into Host Cells. In: Klasse PJ, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Volume 129: Academic Press; 2015. p. 63-107.
79. Krey T, d'Alayer J, Kikuti CM, Saulnier A, Damier-Piolle L, Petitpas I, et al. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog.* 2010;6(2):e1000762.
80. Khan AG, Whidby J, Miller MT, Scarborough H, Zatorski AV, Cygan A, et al. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature.* 2014;509(7500):381-4.
81. El Omari K, Iourin O, Kadlec J, Sutton G, Harlos K, Grimes JM, et al. Unexpected structure for the N-terminal domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1. *Nat Commun.* 2014;5:4874.
82. Madan V, Bartenschlager R. Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroprotein. *Viruses.* 2015;7(8):4461-81.
83. Moradpour D, Penin F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:113-42.
84. Brass V, Berke JM, Montserret R, Blum HE, Penin F, Moradpour D. Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(38):14545-50.
85. Lam AM, Frick DN. Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol.* 2006;80(1):404-11.
86. Ma Y, Yates J, Liang Y, Lemon SM, Yi M. NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol.* 2008;82(15):7624-39.

87. Lindenbach BD, Pragai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, et al. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol.* 2007;81(17):8905-18.
88. Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F, et al. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat.* 2011;18(5):305-15.
89. Gokhale NS, Vazquez C, Horner SM. Hepatitis C Virus. Strategies to Evade Antiviral Responses. *Future virology.* 2014;9(12):1061-75.
90. Neufeldt CJ, Joyce MA, Van Buuren N, Levin A, Kirkegaard K, Gale M, Jr., et al. The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites. *PLoS Pathog.* 2016;12(2):e1005428.
91. Lindenbach BD. Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:199-218.
92. Blackard JT, Ma G, Limketkai BN, Welge JA, Dryer PD, Martin CM, et al. Variability of the Polymerase Gene (NS5B) in Hepatitis C Virus-Infected Women. *Journal of Clinical Microbiology.* 2010;48(11):4256-9.
93. Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(10):688-700.
94. Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouille Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel).* 2014;3(4):892-921.
95. Dao Thi VL, Dreux M, Cosset FL. Scavenger receptor class B type I and the hypervariable region-1 of hepatitis C virus in cell entry and neutralisation. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e13.
96. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* 2003;278(42):41003-12.
97. Colpitts CC, Baumert TF. Hepatitis C virus cell entry: a target for novel antiviral strategies to address limitations of direct acting antivirals. *Hepato Int.* 2016;10(5):741-8.
98. Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M, Jr. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology.* 2009;394(1):99-108.
99. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science.* 1996;271(5248):518.
100. Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, Ciesek S, Friesland M, Herrmann E, et al. Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol.* 2010;84(11):5751-63.
101. Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guerin M, Mancip J, Granio O, et al. Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem.* 2012;287(37):31242-57.
102. Zhu YZ, Qian XJ, Zhao P, Qi ZT. How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. *World J Gastroenterol.* 2014;20(13):3457-67.
103. Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q, Pizza M, et al. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol.* 2008;82(17):8316-29.

104. Sharma NR, Mateu G, Dreux M, Grakoui A, Cosset FL, Melikyan GB. Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J Biol Chem*. 2011;286(35):30361-76.
105. Feneant L, Potel J, Francois C, Sane F, Douam F, Belouzard S, et al. New Insights into the Understanding of Hepatitis C Virus Entry and Cell-to-Cell Transmission by Using the Ionophore Monensin A. *J Virol*. 2015;89(16):8346-64.
106. Grassi G, Di Caprio G, Fimia GM, Ippolito G, Tripodi M, Alonzi T. Hepatitis C virus relies on lipoproteins for its life cycle. *World J Gastroenterol*. 2016;22(6):1953-65.
107. Chi X, Niu Y, Cheng M, Liu X, Feng Y, Zheng F, et al. Identification of a Potent and Broad-Spectrum Hepatitis C Virus Fusion Inhibitory Peptide from the E2 Stem Domain. *Sci Rep*. 2016;6:25224.
108. Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med*. 2012;18(2):281-5.
109. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S3-S13.
110. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology*. 2002;76(12):5974-84.
111. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog*. 2012;8(12):e1003056.
112. Saxena V, Lai CK, Chao TC, Jeng KS, Lai MM. Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft. *J Virol*. 2012;86(8):4139-50.
113. Lisowski L, Elazar M, Chu K, Glenn JS, Kay MA. The anti-genomic (negative) strand of Hepatitis C Virus is not targetable by shRNA. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(6):3688-98.
114. Falcon V, Acosta-Rivero N, Gonzalez S, Duenas-Carrera S, Martinez-Donato G, Menendez I, et al. Ultrastructural and biochemical basis for hepatitis C virus morphogenesis. *Virus Genes*. 2017;53(2):151-64.
115. Zayas M, Long G, Madan V, Bartenschlager R. Coordination of Hepatitis C Virus Assembly by Distinct Regulatory Regions in Nonstructural Protein 5A. *PLoS Pathog*. 2016;12(1):e1005376.
116. Lauring AS, Frydman J, Andino R. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(5):327-36.
117. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(2):159-216.
118. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):962-73.
119. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol*. 2016;65(1 Suppl):S2-S21.
120. Fishman SL, Branch AD. The Quasispecies Nature and Biological Implications of the Hepatitis C Virus. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2009;9(6):1158-67.
121. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):e1001005.



122. Lauring AS, Acevedo A, Cooper SB, Andino R. Codon usage determines the mutational robustness, evolutionary capacity, and virulence of an RNA virus. *Cell Host Microbe*. 2012;12(5):623-32.
123. McCaffrey K, Gouklani H, Boo I, Pountourios P, Drummer HE. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 1):112-21.
124. Drummer HE, McKeating JA. Hepatitis C Virus Glycoprotein-dependent Entry. In: Tan S-L, He Y, Inc. H-LR, Nutley N, USA, Antiviral Research AL, Abbott Park, IL 60064, USA, editors. *Hepatitis C: Antiviral Drug Discovery and Development*: Caister Academic Press; 2011.
125. Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais P-O, Deléage G, Pawlotsky J-M. Conservation of the Conformation and Positive Charges of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Hypervariable Region 1 Points to a Role in Cell Attachment. *Journal of Virology*. 2001;75(12):5703-10.
126. Callens N, Ciczora Y, Bartosch B, Vu-Dac N, Cosset FL, Pawlotsky JM, et al. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol*. 2005;79(24):15331-41.
127. Beisel J-N, Moreteau J-C. A simple formula for calculating the lower limit of Shannon's diversity index. *Ecological Modelling*. 1997;99(2):289-92.
128. Kimura M. Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature*. 1977;267:275-6.
129. Horn HS. Measurement of "Overlap" in Comparative Ecological Studies. *The American Naturalist*. 1966;100(914):419-24.
130. Marinho RT, Barreira DP. Hepatitis C, stigma and cure. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2013;19(40):6703-9.
131. Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC, et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001;34(2):395-403.
132. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *The Lancet*. 2001;358(9286):958-65.
133. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(25):2405-16.
134. Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *The New England journal of medicine*. 2011;364(13):1195-206.
135. Silva MO, Treitel M, Graham DJ, Curry S, Frontera MJ, McMonagle P, et al. Antiviral activity of boceprevir monotherapy in treatment-naive subjects with chronic hepatitis C genotype 2/3. *Journal of Hepatology*. 2013;59(1):31-7.
136. Li G, De Clercq E. Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Res*. 2017;142:83-122.
137. Vernaz N, Girardin F, Goossens N, Brugger U, Riguzzi M, Perrier A, et al. Drug Pricing Evolution in Hepatitis C. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157098.
138. James JL, Carter AM, Chamley LW. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta*. 2012;33(5):327-34.

139. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, et al. Trophoblast L-Selectin-Mediated Adhesion at the Maternal-Fetal Interface. *Science*. 2003;299(5605):405-8.
140. Steeber DA, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Tedder TF. Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *The Journal of Immunology*. 1997;159(2):952-63.
141. Bentin-Ley U. Relevance of endometrial pinopodes for human blastocyst implantation. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2000;15 Suppl 6:67-73.
142. Fukuda MN, Sugihara K. An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2008;34(2):129-36.
143. McEwan M, Lins RJ, Munro SK, Vincent ZL, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Cytokine regulation during the formation of the fetal–maternal interface: Focus on cell–cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009;20(3):241-9.
144. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*. 2014;35(6):851-905.
145. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*. 2012;18(12):1754-67.
146. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med*. 2007;25(6):445-53.
147. Morelli S, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Research and Reports in Biology*. 2015:171.
148. Degner K, Magness RR, Shah DM. Establishment of the Human Uteroplacental Circulation: A Historical Perspective. *Reprod Sci*. 2017;24(5):753-61.
149. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1663):20140066.
150. Robbins JR, Bakardjiev AI. Pathogens and the placental fortress. *Curr Opin Microbiol*. 2012;15(1):36-43.
151. Delorme-Axford E, Sadovsky Y, Coyne CB. The Placenta as a Barrier to Viral Infections. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):133-46.
152. Velicky P, Knofler M, Pollheimer J. Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control. *Cell Adh Migr*. 2016;10(1-2):154-62.
153. Fu B, Wei H. Decidual natural killer cells and the immune microenvironment at the maternal-fetal interface. *Sci China Life Sci*. 2016;59(12):1224-31.
154. 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.
155. Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest*. 2010;120(4):1016-25.
156. Tang Z, Abrahams VM, Mor G, Guller S. Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1221:103-8.
157. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):425-33.

158. Chen SJ, Liu YL, Sytwu HK. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:258391.
159. Kumpel BM, Manoussaka MS. Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sang.* 2012;102(1):2-12.
160. Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *Journal of Leukocyte Biology.* 2011;90(4):703-16.
161. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med.* 2007;13(12):1450-7.
162. Kämmerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TBH, Dietl J, et al. Unique Appearance of Proliferating Antigen-Presenting Cells Expressing DC-SIGN (CD209) in the Decidua of Early Human Pregnancy. *The American Journal of Pathology.* 2003;162(3):887-96.
163. Arck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med.* 2013;19(5):548-56.
164. Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:967629.
165. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.* 2012;62(3):263-71.
166. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology.* 2000;12(6):731-7.
167. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, et al. Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy. *The Journal of Immunology.* 2009;182(9):5488.
168. Piccinni M-P. T cell tolerance towards the fetal allograft. *Journal of Reproductive Immunology.* 2010;85(1):71-5.
169. Keelan JA, Sato TA, Mitchell MD. Comparative Studies on the Effects of Interleukin-4 and Interleukin-13 on Cytokine and Prostaglandin E2 Production by Amnion-derived WISH Cells. *American Journal of Reproductive Immunology.* 1998;40(5):332-8.
170. Goodwin VJ, Sato TA, Mitchell MD, Keelan JA. Anti-inflammatory Effects of Interleukin-4, Interleukin-10, and Transforming Growth Factor- $\beta$  on Human Placental Cells In Vitro. *American Journal of Reproductive Immunology.* 1998;40(5):319-25.
171. Chen T, Darrasse-Jeze G, Bergot AS, Courau T, Churlaud G, Valdivia K, et al. Self-specific memory regulatory T cells protect embryos at implantation in mice. *J Immunol.* 2013;191(5):2273-81.
172. Aluvihare V, Betz A. The Role of Regulatory T Cells in Materno-Fetal Tolerance. In: Bioscience L, editor. *Madame Curie Bioscience Database.* Austin (TX)2000-2013.
173. Moldenhauer LM, Diener KR, Thring DM, Brown MP, Hayball JD, Robertson SA. Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. *J Immunol.* 2009;182(12):8080-93.
174. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(1):17-21.
175. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):317-26.

176. Conte D, Fraquelli M, Prati D, Colucci A, Minola E. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology*. 2000;31(3):751-5.
177. Gervais A, Bacq Y, Bernuau J, Martinet M, Auperin A, Bayer N, et al. Decrease in serum  $\alpha$ T and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*. 2000;32:293-9.
178. Paternoster DM, Santarossa C, Grella P, Palu G, Baldo V, Boccagni P, et al. Viral Load in HCV RNA-Positive Pregnant Women. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001;96(9):2751-4.
179. Wejstål R, Widell A, Norkrans G. HCV-RNA levels increase during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1998;30(2):111-3.
180. McGovern BH, Birch CE, Bowen MJ, Reyor LL, Nagami EH, Chung RT, et al. Improving the diagnosis of acute hepatitis C virus infection with expanded viral load criteria. *Clin Infect Dis*. 2009;49(7):1051-60.
181. Floreani A. Hepatitis C and pregnancy. *World J Gastroenterol*. 2013;19(40):6714-20.
182. Jhaveri R, Swamy GK. Hepatitis C Virus in Pregnancy and Early Childhood: Current Understanding and Knowledge Deficits. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3 Suppl 1:S13-8.
183. Prasad MR, Honegger JR. Hepatitis C virus in pregnancy. *Am J Perinatol*. 2013;30(2):149-59.
184. Hattori Y, Orito E, Ohno T, Sugauchi F, Suzuki S, Sugiura M, et al. Loss of hepatitis C virus RNA after parturition in female patients with chronic HCV infection. *J Med Virol*. 2003;71(2):205-11.
185. Hashem M, Jhaveri R, Saleh DaA, Sharaf SA, El-Mougy F, Abdelsalam L, et al. Spontaneous Viral Load Decline and Subsequent Clearance of Chronic Hepatitis C Virus in Postpartum Women Correlates With Favorable Interleukin-28B Gene Allele. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(6):999-1005.
186. Pergam SA, Wang CC, Gardella CM, Sandison TG, Phipps WT, Hawes SE. Pregnancy complications associated with hepatitis C: data from a 2003-2005 Washington state birth cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(1):38 e1-9.
187. Buresi MC, Lee J, Gill S, Kong JM, Money DM, Yoshida EM, et al. The Prevalence of Gestational Diabetes Mellitus and Glucose Abnormalities in Pregnant Women With Hepatitis C Virus Infection in British Columbia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. 2010;32(10):935-41.
188. Reddick KLB, Jhaveri R, Gandhi M, James AH, Swamy GK. Pregnancy outcomes associated with viral hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis*. 2011;18(7):e394-e8.
189. Safir A, Levy A, Sikuler E, Sheiner E. Maternal hepatitis B virus or hepatitis C virus carrier status as an independent risk factor for adverse perinatal outcome. *Liver International*. 2010;30(5):765-70.
190. Le Champion A, Larouche A, Fauteux-Daniel S, Soudeyans H. Pathogenesis of hepatitis C during pregnancy and childhood. *Viruses*. 2012;4(12):3531-50.
191. Babik JM, Cohan D, Monto A, Hartigan-O'Connor DJ, McCune JM. The human fetal immune response to hepatitis C virus exposure in utero. *J Infect Dis*. 2011;203(2):196-206.
192. 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.

193. 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.
194. Giugliano S, Petroff MG, Warren BD, Jasti S, Linscheid C, Ward A, et al. Hepatitis C Virus Sensing by Human Trophoblasts Induces Innate Immune Responses and Recruitment of Maternal NK Cells: Potential Implications for Limiting Vertical Transmission. *J Immunol*. 2015;195(8):3737-47.
195. Deng J, Xu X, Fang J, Guo Y. Primary Human Trophoblasts Expressing Four Essential Receptors of Hepatitis C Virus Entry but Resistance to Infection in Vitro. *Gynecology & Obstetrics*. 2015;5(11):1-5.
196. Shen L, Diao Z, Sun H-X, Yan G-J, Wang Z, Li R-T, et al. Up-regulation of CD81 inhibits cytotrophoblast invasion and mediates maternal endothelial cell dysfunction in preeclampsia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(8):1940-5.
197. Lievano S, Alarcon L, Chavez-Munguia B, Gonzalez-Mariscal L. Endothelia of term human placentae display diminished expression of tight junction proteins during preeclampsia. *Cell Tissue Res*. 2006;324(3):433-48.
198. Indolfi G, Resti M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *Journal of Medical Virology*. 2009;81(5):836-43.
199. Azzari C, Resti M, Moriondo M, Ferrari R, Lionetti P, Vierucci A. Vertical transmission of HCV is related to maternal peripheral blood mononuclear cell infection. *Blood*. 2000;96(6):2045-8.
200. 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. *J Med Virol*. 2008;80(1):65-71.
201. Tovo PA, Calitri C, Scolfaro C, Gabiano C, Garazzino S. Vertically acquired hepatitis C virus infection: Correlates of transmission and disease progression. *World J Gastroenterol*. 2016;22(4):1382-92.
202. Thomas DL, Villano SA, Riester KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH, et al. Perinatal Transmission of Hepatitis C Virus from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Mothers. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998;177(6):1480-8.
203. Mast EE, Hwang L-Y, Seto DSY, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, et al. Risk Factors for Perinatal Transmission of Hepatitis C Virus (HCV) and the Natural History of HCV Infection Acquired in Infancy. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(11):1880-9.
204. Hayashida A, Inaba N, Oshima K, Nishikawa M, Shoda A, Hayashida S, et al. Re-evaluation of the true rate of hepatitis C virus mother-to-child transmission and its novel risk factors based on our two prospective studies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2007;33(4):417-22.
205. Indolfi G, Azzari C, Moriondo M, Lippi F, de Martino M, Resti M. Alanine transaminase levels in the year before pregnancy predict the risk of hepatitis C virus vertical transmission. *Journal of Medical Virology*. 2006;78(7):911-4.
206. Cottrell E, Chou R, Wasson N, Rahman B, Guise J. Reducing risk for mother-to-infant transmission of hepatitis c virus: A systematic review for the u.s. preventive services task force. *Annals of Internal Medicine*. 2013;158(2):109-13.
207. Baré P. Hepatitis C virus and peripheral blood mononuclear cell reservoirs Patricia Baré. *World Journal of Hepatology*. 2009;1(1):67-71.

208. Waldron PR, Holodniy M. Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression Remains Broadly Altered Years after Successful Interferon-Based Hepatitis C Virus Treatment. *J Immunol Res.* 2015;2015:958231.
209. Natarajan V, Kottlil S, Hazen A, Adelsberger J, Murphy AA, Polis MA, et al. HCV in peripheral blood mononuclear cells are predominantly carried on the surface of cells in HIV/HCV co-infected individuals. *J Med Virol.* 2010;82(12):2032-7.
210. Dawe GS, Tan XW, Xiao Z-C. Cell Migration from Baby to Mother. *Cell Adhesion & Migration.* 2007;1(1):19-27.
211. Tosone G, Maraolo AE, Mascolo S, Palmiero G, Tambaro O, Orlando R. Vertical hepatitis C virus transmission: Main questions and answers. *World J Hepatol.* 2014;6(8):538-48.
212. 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.* 2007;44(8):1123-31.
213. Kennedy CE, Yeh PT, Pandey S, Betran AP, Narasimhan M. Elective cesarean section for women living with HIV: a systematic review of risks and benefits. *AIDS.* 2017;31(11):1579-91.
214. 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. *J Virol.* 2011;85(16):8253-62.
215. Mok J, Pembrey L, Tovo P, Newell M, et al. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition.* 2005;90(2):F156-F60.
216. Manzin A, Solforosi L, Debiaggi M, Zara F, Tanzi E, Romanò L, et al. Dominant Role of Host Selective Pressure in Driving Hepatitis C Virus Evolution in Perinatal Infection. *Journal of Virology.* 2000;74(9):4327-34.
217. 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.
218. 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.
219. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. FDA approves two hepatitis C drugs for pediatric patients 2017 [updated 04-07-2017. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION]. Available from: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm551407.htm>.
220. Murray KF, Balistreri W, Bansal S, Whitworth S, Evans H, Gonzalez-Peralta RP, et al. Ledipasvir/sofosbuvir ± ribavirin for 12 or 24 weeks is safe and effective in children 6–11 years old with chronic hepatitis C infection. *EASL International Liver Congress 2017 Abstract #PS-101*; Amsterdam, The Netherlands.
221. Liu L, Fisher BE, Dowd KA, Astemborski J, Cox AL, Ray SC. Acceleration of hepatitis C virus envelope evolution in humans is consistent with progressive humoral immune selection during the transition from acute to chronic infection. *J Virol.* 2010;84(10):5067-77.
222. Booth JC, Kumar U, Webster D, Monjardino J, Thomas HC. Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology.* 1998;27(1):223-7.

223. Christie JM, Chapel H, Chapman RW, Rosenberg WM. Immune selection and genetic sequence variation in core and envelope regions of hepatitis C virus. *Hepatology*. 1999;30(4):1037-44.
224. van Doorn LJ, Capriles I, Maertens G, DeLeys R, Murray K, Kos T, et al. Sequence evolution of the hypervariable region in the putative envelope region E2/NS1 of hepatitis C virus is correlated with specific humoral immune responses. *Journal of Virology*. 1995;69(2):773-8.
225. Canobio S, Guilbert CM, Troesch M, Samson J, Lemay M, Pelletier VA, et al. 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*. 2004;42(9):4365-9.
226. Quesnel-Vallieres M, Lemay M, Lapointe N, Martin SR, Soudeyns H. HCV quasispecies evolution during treatment with interferon alfa-2b and ribavirin in two children coinfecting with HCV and HIV-1. *J Clin Virol*. 2008;43(2):236-40.
227. Farci P, Quinti I, Farci S, Alter HJ, Strazzera R, Palomba E, et al. Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(22):8475-80.
228. Farci P, Strazzera R, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, et al. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3081-6.
229. Resti M, Jara P, Hierro L, Azzari C, Giacchino R, Zuin G, et al. Clinical features and progression of perinatally acquired hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 2003;70(3):373-7.
230. El-Kamary SS, Hashem M, Saleh DA, Abdelwahab SF, Sobhy M, Shebl FM, et al. Hepatitis C Virus-Specific Cell-Mediated Immune Responses in Children Born to Mothers Infected with Hepatitis C Virus. *The Journal of Pediatrics*. 2013;162(1):148-54.
231. Dowd KA, Hershov RC, Yawetz S, Larussa P, Diaz C, Landesman SH, et al. Maternal neutralizing antibody and transmission of hepatitis C virus to infants. *J Infect Dis*. 2008;198(11):1651-5.
232. Nie QH, Gao LH, Cheng YQ, Huang XF, Zhang YF, Luo XD, et al. Hepatitis C virus infection of human cytotrophoblasts cultured in vitro. *J Med Virol*. 2012;84(10):1586-92.
233. Vidricaire G, Gauthier S, Tremblay MJ. HIV-1 infection of trophoblasts is independent of gp120/CD4 Interactions but relies on heparan sulfate proteoglycans. *J Infect Dis*. 2007;195(10):1461-71.
234. Martin DN, Uprichard SL. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(26):10777-82.
235. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci*. 2015;282(1821):20143085.
236. Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood*. 2007;110(8):2948.
237. Ridings, Dinan, Williams, Robertson, Zola. Somatic mutation of immunoglobulin VH6 genes in human infants. *Clinical & Experimental Immunology*. 1998;114(1):33-9.
238. Pihlgren M, Friedli M, Tougne C, Rochat A-F, Lambert P-H, Siegrist C-A. Reduced Ability of Neonatal and Early-Life Bone Marrow Stromal Cells to Support Plasmablast Survival. *The Journal of Immunology*. 2005;176(1):165.

239. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:985646.
240. Kristoffersen EK. Placental Fc receptors and the transfer of maternal IgG. *Transfusion Medicine Reviews*. 2000;14(3):234-43.
241. Pyzik M, Rath T, Lencer WI, Baker K, Blumberg RS. FcRn: The Architect Behind the Immune and Nonimmune Functions of IgG and Albumin. *J Immunol*. 2015;194(10):4595-603.
242. Boppana SB, Britt WJ. Antiviral Antibody Responses and Intrauterine Transmission after Primary Maternal Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995;171(5):1115-21.
243. Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Fisher S. Human Cytomegalovirus Transmission from the Uterus to the Placenta Correlates with the Presence of Pathogenic Bacteria and Maternal Immunity. *Journal of Virology*. 2003;77(24):13301-14.
244. 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. *Am J Pathol*. 2006;168(4):1210-26.
245. Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: Insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology*. 2006;44(1):15-22.
246. Resti M, Azzari C, Moriondo M, Betti L, Sforzi I, Novembre E, et al. Injection Drug Use Facilitates Hepatitis C Virus Infection of Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;35(3):236-9.
247. Di Lello FA, Culasso ACA, Parodi C, Baré P, Campos RH, García G. New evidence of replication of hepatitis C virus in short-term peripheral blood mononuclear cell cultures. *Virus Research*. 2014;191:1-9.
248. Jabłońska J, Ząbek J, Pawełczyk A, Kubisa N, Fic M, Laskus T, et al. Hepatitis C virus (HCV) infection of peripheral blood mononuclear cells in patients with type II cryoglobulinemia. *Human Immunology*. 2013;74(12):1559-62.
249. Pawełczyk A, Kubisa N, Jabłońska J, Bukowska-Oško I, Caraballo Cortes K, Fic M, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) negative strand RNA and NS3 protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): CD3(+), CD14(+) and CD19(+). *Virology Journal*. 2013;10:346.
250. Jeanty C, Derderian SC, Mackenzie TC. Maternal-fetal cellular trafficking: clinical implications and consequences. *Curr Opin Pediatr*. 2014;26(3):377-82.
251. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Bianchi DW. Maternal cell microchimerism in newborn tissues. *The Journal of Pediatrics*. 2003;142(1):31-5.
252. Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, Pembrey L, Newell M-L, Tovo P-A, et al. Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. *Virology*. 2009;390(1):64-70.
253. MacDonald KS, Embree J, Njenga S, Nagelkerke NJD, Ngatia I, Mohammed Z, et al. Mother-Child Class I HLA Concordance Increases Perinatal Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998;177(3):551-6.
254. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal Alloantigens Promote the Development of Tolerogenic Fetal Regulatory T Cells in Utero. *Science (New York, NY)*. 2008;322(5907):1562-5.
255. Gammill HS, Adams Waldorf KM, Aydelotte TM, Lucas J, Leisenring WM, Lambert NC, et al. Pregnancy, microchimerism, and the maternal grandmother. *PLoS One*. 2011;6(8):e24101.



256. Chandwani S, Greco MA, Mittal K, Antoine C, Krasinski K, Borkowsky W. Pathology and Human Immunodeficiency Virus Expression in Placentas of Seropositive Women. *The Journal of Infectious Diseases*. 1991;163(5):1134-8.
257. Gichangi P, Nyong'o A, Temmerman M. Pregnancy outcome and placental weights: their relationship to HIV-1 infection. *East African Medical Journal*. 1993;70:85-9.
258. D'costa G, Khadke K, Vishwasrao P. Pathology of placenta in HIV infection. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*. 2007;50:515-9.
259. Schuetz AN, Guarner J, Packard MM, Zaki SR, Shehata BM, Opreas-Ilie G. Infectious Disease Immunohistochemistry in Placentas from HIV-Positive and HIV-Negative Patients. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2011;14(3):180-8.
260. Goldenberg RL, Vermund SH, Goepfert AR, Andrews WW. Choriodecidual inflammation: a potentially preventable cause of perinatal HIV-1 transmission? *The Lancet*. 1998;352(9144):1927-30.
261. Burton GJ, O'Shea S, Rostron T, Mullen JE, Swati Aiyer, Skepper JN, et al. Significance of Placental Damage in Vertical Transmission of Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Medical Virology*. 1996;50:237-43.
262. Singh P, Agnihotri SK, Tewari MC, Kumar S, Sachdev M, Tripathi RK. HIV-1 Nef breaches placental barrier in rat model. *PLoS One*. 2012;7(12):e51518.
263. Chisanga C, Eggert D, Mitchell CD, Wood C, Angeletti PC. Evidence for Placental HPV Infection in Both HIV Positive and Negative Women. *J Cancer Ther*. 2015;6(15):1276-89.
264. Perrault SD, Hajek J, Zhong K, Owino SO, Sichangi M, Smith G, et al. Human Immunodeficiency Virus Co-Infection Increases Placental Parasite Density and Transplacental Malaria Transmission in Western Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;80(1):119-25.
265. Ng S, Schwartz RE, March S, Galstian A, Gural N, Shan J, et al. Human iPSC-derived hepatocyte-like cells support Plasmodium liver-stage infection in vitro. *Stem Cell Reports*. 2015;4(3):348-59.
266. Manzoni G, Marinach C, Topcu S, Briquet S, Grand M, Tolle M, et al. Plasmodium P36 determines host cell receptor usage during sporozoite invasion. *Elife*. 2017;6.
267. Mariné-Barjoan E, Berrébi A, Giordanengo V, Favre SF, Haas H, Moreigne M, et al. HCV/HIV co-infection, HCV viral load and mode of delivery: risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus? *AIDS*. 2007;21:1811-5.
268. Checa Cabot CA, Stoszek SK, Quarleri J, Losso MH, Ivalo S, Peixoto MF, et al. Mother-to-Child Transmission of Hepatitis C Virus (HCV) Among HIV/HCV-Coinfected Women. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2013;2(2):126-35.
269. Abu-Raya B, Smolen KK, Willems F, Kollmann TR, Marchant A. Transfer of Maternal Antimicrobial Immunity to HIV-Exposed Uninfected Newborns. *Front Immunol*. 2016;7:338.
270. Slogrove A, Reikie B, Naidoo S, De Beer C, Ho K, Cotton M, et al. HIV-Exposed Uninfected Infants are at Increased Risk for Severe Infections in the First Year of Life. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2012;58(6):505-8.
271. Reikie BA, Adams RCM, Leligdowicz A, Ho K, Naidoo S, Rusk CE, et al. Altered innate immune development in HIV-exposed uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014;66(3):245-55.
272. Ding Q, von Schaewen M, Ploss A. The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism. *Cell Host Microbe*. 2014;16(5):562-8.

273. Bhatnagar J, Rabeneck DB, Martines RB, Reagan-Steiner S, Ermias Y, Estetter LB, et al. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(3):405-14.
274. Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clinical Microbiology and Infection.* 2011;17(9):1285-93.
275. Weisblum Y, Panet A, Zakay-Rones Z, Haimov-Kochman R, Goldman-Wohl D, Ariel I, et al. Modeling of human cytomegalovirus maternal-fetal transmission in a novel decidual organ culture. *J Virol.* 2011;85(24):13204-13.
276. Goegebuer T, Van Meensel B, Beuselinck K, Cossey V, Van Ranst M, Hanssens M, et al. Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *J Clin Microbiol.* 2009;47(3):660-5.
277. Marrs C, Olson G, Saade G, Hankins G, Wen T, Patel J, et al. Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. *Am J Perinatol.* 2016;33(7):625-39.
278. Zorn AM, Wells JM. Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2009;25(1):221-51.
279. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development.* 2015;142(12):2094-108.
280. Moscovitz JE, Aleksunes LM. Establishment of metabolism and transport pathways in the rodent and human fetal liver. *Int J Mol Sci.* 2013;14(12):23801-27.
281. Wu X, Robotham JM, Lee E, Dalton S, Kneteman NM, Gilbert DM, et al. Productive hepatitis C virus infection of stem cell-derived hepatocytes reveals a critical transition to viral permissiveness during differentiation. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002617.
282. Yan F, Wang Y, Zhang W, Chang M, He Z, Xu J, et al. Human embryonic stem cell-derived hepatoblasts are an optimal lineage stage for hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2017;66(3):717-35.
283. Brett KE, Ferraro ZM, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo KB. Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):16153-85.
284. Wadsack C, Hammer A, Levak-Frank S, Desoye G, Kozarsky KF, Hirschmugl B, et al. Selective Cholesteryl Ester Uptake from High Density Lipoprotein by Human First Trimester and Term Villous Trophoblast Cells. *Placenta.* 2003;24(2):131-43.
285. Furuhashi M, Seo H, Mizutani S, Narita O, Tomoda Y, Matsui N. Expression of Low Density Lipoprotein Receptor Gene in Human Placenta during Pregnancy. *Molecular Endocrinology.* 1989;3(8):1252-6.
286. McArdle HJ, Douglas AJ, Bowen BJ, Morgan EH. The mechanism of iron uptake by the rat placenta. *Journal of Cellular Physiology.* 1985;124(3):446-50.
287. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface. *Reviews of Reproduction.* 1999;4:81-9.
288. Thomas MR, Tutschek B, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, Craft I, et al. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenatal Diagnosis.* 1995;15(7):641-6.
289. Correspondence. *British Journal of Haematology.* 1998;100(3):605-18.
290. Jordan MR, Kearney M, Palmer S, Shao W, Maldarelli F, Coakley EP, et al. Comparison of standard PCR/cloning to single genome sequencing for analysis of HIV-1 populations. *J Virol Methods.* 2010;168(1-2):114-20.

291. Etemad B, Smith MG, Gonzalez O, White LF, Sagar M. Single genome amplification and standard bulk PCR yield HIV-1 envelope products with similar genotypic and phenotypic characteristics. *Journal of virological methods*. 2015;214:46-53.
292. Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J. Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol*. 2010;84(19):10159-68.
293. Lavie M, Goffard A, Dubuisson J. HCV Glycoproteins: Assembly of a Functional E1–E2 Heterodimer. In: Tan S, editor. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
294. Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, Keck Z, et al. Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology*. 2004;78(6):2994-3002.
295. Bartosch B, Verney G, Dreux M, Donot P, Morice Y, Penin F, et al. An Interplay between Hypervariable Region 1 of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein, the Scavenger Receptor BI, and High-Density Lipoprotein Promotes both Enhancement of Infection and Protection against Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*. 2005;79(13):8217-29.
296. 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. *Nat Med*. 2013;19(11):1529-33.

