

Université de Montréal

Étude des polymorphismes génétiques impliqués dans la résistance du virus de l'hépatite C
au traitement

par
Marie-Jeanne Bertrand

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences
en microbiologie et immunologie

août 2006

©Marie-Jeanne Bertrand, 2006



Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des polymorphismes génétiques impliqués dans la résistance du virus de l'hépatite C
au traitement

présenté par :

Marie-Jeanne Bertrand

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hugo Soudeyns Ph.D.

Michel Roger M.D., Ph.D.

Claudine Matte Ph.D.

Donald Murphy Ph.D.

Résumé

Plusieurs études ont révélé l'implication de facteurs viraux et de l'hôte dans la réponse au traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC). Dans la présente étude, les gènes E2, NS5A et NS3 ont été séquencés directement chez 24 patients infectés chroniquement par le génotype 1 du VHC avant le début du traitement combinant l'interféron α -2b pégylé et la ribavirine. Les techniques de clonage et séquençage ont servi à caractériser l'évolution génétique des quasi-espèces HVR1 en prétraitement. L'éradication complète de l'ARN du VHC a été observée chez 7 patients (29,2%). Le jeune âge, le sexe féminin et le faible grade histologique sont associés à l'obtention d'une meilleure réponse à la thérapie antivirale, bien que les résultats obtenus soient à la limite du seuil de signification. Ainsi, seul le statut thérapeutique est corrélé de façon significative au pronostic clinique à 72 semaines. Nous avons observé une tendance, chez les patients en échec thérapeutique, à présenter une plus grande complexité et diversité génétique des quasi-espèces HVR1 par comparaison aux répondeurs soutenus, mais cette différence est non significative. Le nombre total de substitutions présentes au sein des régions investiguées des gènes E2 (HVR2, CD81-1 et CD81-2) et NS5A (ISDR, domaine de fixation à PKR et V3) n'est pas un critère de distinction des différents groupes de réponse des patients à la bithérapie antivirale. Quoique la sérine protéase NS3 soit considérée, dans certaines études, comme l'une des régions les moins variables du génome viral, un degré significatif de variabilité a été observé parmi les séquences nucléotidiques des patients non répondeurs (P groupe 1 = 0,042). La présence substantielle de polymorphismes dans la sérine protéase NS3 suggère que, malgré les contraintes fonctionnelles et structurales, cette enzyme est suffisamment flexible pour tolérer des substitutions nucléotidiques et aminées. Nul doute que certains facteurs viraux et de l'hôte sont impliqués dans la résistance du VHC à la bithérapie antivirale, mais l'analyse subséquente des régions génomiques ciblées dans cette étude, à partir d'une plus grande cohorte de patients, permettra d'affiner la prédiction de la réponse au traitement.

Mots clés : hépatite C (VHC), résistance à la bithérapie combinant l'interféron α -2b pégylé et la ribavirine, quasi-espèces, génotypes, région hypervariable 1 (HVR1), sérine protéase NS3, NS5A, glycoprotéine d'enveloppe 2 (E2), récepteur CD81.

Abstract

Several studies have linked host and viral factors to treatment response in hepatitis C virus (HCV) infection. In the present study, the E2, NS5A and NS3 genes were directly sequenced from 24 patients chronically infected with HCV genotype 1 prior to the initiation of treatment that combined peginterferon alfa-2b and ribavirin. Cloning and sequencing techniques were used in order to characterize the genetic evolution of HCV second envelope gene hypervariable region 1 (HVR1) quasispecies before treatment. Sustained HCV RNA clearance was achieved in 29,2% of patients. Young age, female gender and low histological grading were associated with achievement of a greater response to antiviral therapy, even though the results obtained were at the limit of significance. Thus, clinical status was the only host factor that was significantly correlated to clinical prognosis at 72 weeks. We have observed a trend among patients with treatment failure to show a greater genetic complexity and diversity of HVR1 quasispecies in comparison with sustained virological responders, but the difference was not statistically significant. Total number of substitutions present among the regions investigated in E2 (HVR2, CD81-1 and CD81-2) and NS5A (ISDR, PKR binding-domain and V3) genes wasn't a distinctive criteria of the different patient group response to antiviral treatment. Although NS3 serine protease was considered, in some studies, to be one of the least variable regions of the viral genome, significant variability was observed among nucleotide sequences of non responders (P groupe 1 = 0,042). The substantial presence of polymorphisms in NS3 serine protease suggests that, despite the numerous functional and structural constraints, the enzyme is sufficiently flexible to tolerate nucleotide and amino acid substitutions. No doubt that certain host and viral factors are implicated in HCV resistance to antiviral therapy. Future studies should aim at analyzing a greater number of patients in order to allow the refinement of antiviral therapy response prediction.

Key words: hepatitis C virus (HCV), treatment resistance combining peginterferon alfa-2b and ribavirin, quasispecies, genotypes, hypervariable region 1 (HVR1), NS3 serine protease, NS5A, second envelope glycoprotein (E2), CD81 receptor.

Table des matières

Titre du mémoire	i
Identification du jury	ii
Résumé en français	iii
Résumé en anglais	iv
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
Liste des acides aminés	xvi
Liste des bases dégénérées	xvii
Remerciements	xviii
Avant-propos	xix
Introduction	1
L'historique du virus	1
Épidémiologie et modes de transmission du VHC	1
Pathogenèse et manifestations cliniques	4
Atteintes hépatiques	4
Hépatite aiguë	4
Hépatite chronique	5
Atteintes extra-hépatiques	6
Tests diagnostiques actuels	7
Tests de dépistage des anticorps anti-VHC	7
Épreuves de dépistage de l'ARN du VHC	8
Dosages qualitatifs	8
Dosages quantitatifs	9
Monitoring du VHC	9

Alanine transaminase	9
Biopsie du foie	10
Biologie du foie	10
Grade et stade histologique de l'hépatite chronique	11
Taxonomie du VHC	13
Nomenclature et géotypes	13
Structure et organisation du génome viral	14
Région 5' non codante (IRES)	14
Cadre de lecture ouvert (ORF)	15
Région 3' non codante	15
Cycle cellulaire et réplication	15
Adsorption et entrée	16
Traduction et maturation de la polyprotéine	17
Réplication	18
Assemblage et sortie	19
Cycle de réplication et tropisme cellulaire	19
Récepteur CD81	20
Protéines virales	21
Capside	21
Glycoprotéines E1 et E2	22
p7	23
NS2	24
NS3 et NS4A	24
Domaine sérine protéase	25
Domaine NTPase/hélicase	25
NS4B	25
NS5A	26
NS5B	26
Protéine F	27
Variabilité génétique virale	27
Traitements antiviraux	27

Mécanisme antiviral de l'interféron de type I	28
2',5'-oligoadénylate synthétase (OAS)/RNase L	29
Protéine kinase R (PKR)	29
Ribavirine	30
Facteurs impliqués dans l'échec thérapeutique	31
Régime thérapeutique	31
Facteurs de l'hôte	32
Facteurs viraux	33
Charge virale	33
Génotypes	33
Quasi-espèces	34
Mécanismes de persistance virale	35
Sérine protéase NS3	35
NS5A et E2	37
ISDR	37
PePHD	39
Quasi-espèces : région hypervariable 1 (HVR1)	39
Hypothèses et objectifs	42
Matériel et méthodes	44
Cohorte et protocole clinique	44
Extraction de l'ARN	45
Réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)	45
Gènes E2 et NS5A	45
Région HVR1	46
Gène NS3	46
Migration et purification des produits de PCR	47
Clonage de la région HVR1	50
Ligation	50
Transformation	50
Amplification des clones	50
Réaction de séquence	51

Précipitation des produits de PCR	51
Séquençage	52
Analyse génétique et statistique	52
Analyse des paramètres génétiques	52
Analyse de mutations	53
Tests statistiques	53
Résultats	54
Discussion	79
Conclusion	91
Bibliographie	92
Annexes	xx

Liste des tableaux

- I. Interprétation des résultats de l'épreuve de dépistage de l'ARN du VHC chez les patients anti-VHC positifs.
- II. Modification de l'index de l'activité histologique (HAI) pour le grade : scores nécroinflammatoires.
- III. Évaluation modifiée pour le stade : changements architecturaux, fibrose et cirrhose
- IV. Amorces de la RT-PCR nichée utilisées pour l'amplification des gènes E2 et NS5A du VHC.
- V. Amorces de la RT-PCR utilisées pour l'amplification de la région HVR1 du VHC.
- VI. Amorces de la RT-PCR utilisées pour l'amplification du gène NS3 du VHC.
- VII. Amorces internes utilisées dans la réaction de séquence du gène NS5A.
- VIII. Caractéristiques cliniques et démographiques des patients infectés par le VHC 1a/1b en relation avec la réponse au traitement.
- IX. Comparaison des paramètres génétiques de la région HVR1 du VHC entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.
- X. Comparaison des paramètres génétiques de la région E2 excluant HVR1 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.
- XI. Comparaison des paramètres génétiques de la région NS5A entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.
- XII. Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région HVR2 de E2 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.
- XIII. Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région CD81-1 de E2 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.
- XIV. Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région CD81-2 de E2 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.

- XV. Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région ISDR de NS5A entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.
- XVI. Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans le domaine de fixation à PKR de NS5A entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.
- XVII. Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région V3 de NS5A entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.
- XVIII. Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans le domaine sérine protéase de NS3 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse.

Liste des figures

1. Prévalence globale de l'infection par le VHC, juin 1999.
2. Principaux facteurs de risque dans le cas d'hépatite C aiguë, 1999-2001.
3. Représentation schématisée de la réponse clinique suivant l'infection aiguë par le VHC.
4. Représentation schématisée de la réponse clinique suivant l'infection chronique à VHC.
5. Schéma général des conséquences de l'infection par le virus de l'hépatite C.
6. Structure du VHC.
7. Distribution mondiale des génotypes du VHC.
8. IRES du VHC.
9. Structure 3'NC du VHC.
10. Représentation du cycle de réplication du VHC.
11. Structure du génome VHC et maturation de la polyprotéine précurseur.
12. Schéma illustrant l'association membranaire des protéines non structurales du VHC au réticulum endoplasmique.
13. Structure du CD81.
14. Modèle de la glycoprotéine E2 du VHC.
15. Structure tridimensionnelle de la protéase NS3 complexée avec le co-facteur NS4A.
16. Voie de signalisation Jak-STAT induite par l'interféron de type I.
17. Évolution de l'efficacité du traitement de l'hépatite C chronique.
18. Voie de signalisation des récepteurs Toll-like.
19. Induction et inhibition de la synthèse d'interféron.
20. Rôle de NS5A dans la régulation de PKR durant l'infection par le VHC.
21. Représentation schématisée du protocole thérapeutique.
22. Alignements de séquences en acides aminés correspondant aux régions CD81-1 (A), comprenant le domaine HVR_{2474-482 a.a.}, et CD81-2 (B) de la glycoprotéine E2, soient des acides aminés 474-494 et 522-551 de la polyprotéine du VHC, chez des patients en prétraitement infectés par le VHC-1a et VHC-1b.

23. Alignements de séquences en acides aminés correspondant aux régions du domaine de fixation à PKR de la protéine NS5A (A), incluant le domaine ISDR₂₂₀₉₋₂₂₄₈ a.a., et V3 (B), soient des acides aminés 2209-2274 et 2356-2379 de la polyprotéine du VHC, chez des patients en prétraitement infectés par le VHC-1a et VHC-1b.
24. Alignements de séquences en acides aminés correspondant au domaine sérine protéase de NS3, soient des acides aminés 1027-1207 de la polyprotéine du VHC, chez des patients en prétraitement infectés par le VHC-1a (A) et VHC-1b (B).

Liste des abréviations

a.a.	: Acide aminé
Ac	: Anticorps
ADNc	: ADN complémentaire
ALT	: Alanine transaminase
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ARNdb	: ARN double brin
AST	: Aspartate transaminase
CD81-1	: Région de liaison 1 du récepteur CD81 à la glycoprotéine E2
CD81-2	: Région de liaison 2 du récepteur CD81 à la glycoprotéine E2
CHC	: Carcinome hépatocellulaire
d	: Distance génétique
dS	: Substitution synonyme par site synonyme
dN	: Substitution non synonyme par site non synonyme
dAA	: Substitution d'acide aminé
EIA-1	: Dosage immunoenzymatique de première génération
eIF2- α	: Facteur d'initiation de la traduction des protéines chez les eucaryotes
ELISA	: Dosage immunoenzymatique
ELISA-3	: Dosage immunoenzymatique de 3 ^e génération
ETR	: Réponse virologique initiale suivie d'une rechute (répondeur partiel)
HAI	: Index de l'activité histologique
HVR1	: Région hypervariable 1 de la glycoprotéine E2
HVR2	: Région hypervariable 2 de la glycoprotéine E2
IFN	: Interféron
IRAK	: Kinase associée à l'interleukine-1R
IRES	: Site interne d'entrée du ribosome
IRF	: Facteur de régulation de l'interféron
ISDR	: Région de NS5A déterminant la sensibilité à l'interféron (<i>Interferon sensitivity determining region</i>)

IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
JAK	: Tyrosine kinase de la famille Janus
kDa	: Kilo Daltons
LDL	: Lipoprotéine de faible densité
LEL	: Large boucle extracellulaire de CD81
LPS	: Lipopolysaccharide bactérien
MyD88	: Facteur de différenciation myéloïde 88
Nb.	: Nombre
NC	: Région non codante
NK	: Cellule tueuse naturelle (<i>Natural killer cells</i>)
No.	: Numéro
NR	: Absence de réponse virologique (non répondeur)
NT	: Nucléotide
OMS	: Organisation mondiale de la santé
ORF	: Cadre de lecture ouvert
pb	: Paire de base
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN
PEG	: Pégylé
PePHD	: Domaine d'homologie phosphorylant PKR/eIF2- α (<i>PKR/eIF2-α phosphorylation homology domain</i>)
PKR b.-d.	: Domaine de fixation à la protéine kinase R (<i>PKR binding-domain</i>)
RE	: Réticulum endoplasmique
RER	: Réticulum endoplasmique rugueux
RT	: Transcription inverse
SEL	: Petite boucle extracellulaire de CD81
Sn	: Entropie de Shannon
STAT	: Protéine activatrice de la transcription et transductrice de signal
SVR	: Réponse virologique soutenue (répondeur soutenu)
TAPA-1/CD81	: Cible des anticorps anti-prolifératif 1
TIR	: Récepteur Toll-interleukine 1

TLR	: Récepteur Toll-like
TRAF6	: Récepteur du facteur de nécrose tumorale associé au facteur 6
TRIF	: Domaine TIR doté d'un adaptateur activant l'IFN
VHC	: Virus de l'hépatite C
VHCpp	: Pseudo particule du VHC
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	: Lipoprotéines de très faible densité
V3	: Région hypervariable 3 de NS5A

Liste des acides aminés

<u>Code</u>	<u>Code à 3 lettres</u>	<u>Acide aminé</u>
A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Liste des bases dégénérées (code IUPAC)

<u>Code IUPAC</u>	<u>Bases</u>
A	Adénine
T (ou U)	Thymine (ou Uracile)
G	Guanine
C	Cytosine
N	A, C, G, T
V	G, A, C
B	G, T, C
H	A, T, C
D	G, A, T
K	G, T
S	G, C
W	A, T
M	A, C
Y	C, T
R	A, G

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr Michel Roger, ainsi que ma co-directrice, Dr Claudine Matte, pour tout le support et l'aide qu'ils m'ont apporté depuis le tout début du projet, il y a de cela déjà trois ans. La maîtrise fut pour moi une expérience très enrichissante sur le plan intellectuel et personnel. Malgré les embûches, j'ai réussi à relever le défi grâce à l'aide que m'ont apporté mes collègues de laboratoire, tout particulièrement Julie Lacaille, Annie Jeanneau et Geneviève Boily-Larouche.

J'aimerais porter une attention particulière à mes parents, Pierre et Carole, ainsi qu'à mon conjoint Jonathan, qui ont toujours su m'épauler à tout moment et qui m'ont encouragé à entreprendre des études de doctorat en médecine tout en poursuivant mon travail de maîtrise. Grâce à eux, j'ai pu traverser les moments plus difficiles et surmonter les obstacles qui se présentaient sur mon chemin. Je leur dois beaucoup et pour cela, j'aimerais leur dédier ce travail qui, pour moi, est l'accomplissement d'un très grand projet.

Avant-propos

L'hépatite C est une maladie du foie à progression lente causée par un virus à diffusion hématogène, soit le virus de l'hépatite C (VHC). Bien qu'il existe depuis longtemps, le virus de l'hépatite C n'a été identifié qu'en 1989 et il est aujourd'hui clairement reconnu comme un agent pathogène majeur. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 170 millions d'individus souffrent d'une infection par le virus de l'hépatite C à l'échelle mondiale et le nombre de personnes contaminées par le VHC augmente rapidement au Canada et dans le reste du monde, particulièrement chez les usagers de drogues injectables. Un problème majeur qui est propre au VHC, est sa fréquence élevée de persistance. Plus de 80% des personnes infectées par ce virus développeront une hépatite chronique malgré la présence de titres élevés d'anticorps anti-VHC dirigés contre plusieurs épitopes viraux, ce qui suggère que le VHC a l'habileté d'échapper au système immunitaire de l'hôte et aux mécanismes antiviraux de l'interféron. L'infection chronique par le VHC se définit par la présence de lésions d'hépatite chronique sévère pouvant progresser jusqu'à la cirrhose, ce qui représente la complication ultime de cette infection. De fait, les cirrhoses causées par le VHC constituent actuellement l'indication la plus fréquente de transplantation hépatique en Amérique du Nord.

La monothérapie traditionnelle à l'interféron fut longtemps la thérapie de choix pour le traitement de l'infection par le VHC. Le développement récent d'un régime thérapeutique puissant, soit la combinaison de l'interféron alpha pégylé et la ribavirine, a permis d'accroître l'efficacité de la thérapie antivirale, mais près de la moitié des patients ne répondent pas. L'absence d'éradication de l'infection par le VHC suivant la bithérapie antivirale est possiblement associée au régime thérapeutique, aux facteurs de l'hôte (âge, genre, race, statut thérapeutique et comportements à risque), à la sévérité de la maladie hépatique et aux facteurs viraux. Plusieurs études ont révélé l'implication de facteurs génétiques viraux prédictifs de la réponse au traitement. En effet, les génotypes 1 et 4 du VHC, ainsi qu'une charge virale pré-thérapeutique élevée, sont des facteurs viraux associés à de faibles taux de réponses soutenues à la bithérapie antivirale. De surcroît, plusieurs évidences suggèrent que la nature des quasi-espèces du VHC lui fournit un large répertoire de variants viraux

différents qui seraient impliqués dans la persistance virale par l'élaboration de mécanismes d'évasion du système immunitaire et dans la résistance aux thérapies antivirales.

Les mécanismes par lesquels la majorité des isolats du VHC résistent à la thérapie combinant l'interféron alpha pégylé et la ribavirine ne sont pas très bien définis. Récemment, il a été démontré qu'une région spécifique de la protéine NS5A du VHC (ISDR) a la capacité d'inhiber la protéine kinase R (PKR), un effecteur intracellulaire potentiel de l'activité antivirale de l'interféron alpha. Cependant, plusieurs études ayant investigué précisément la région ISDR ont donné des résultats contradictoires, suggérant que d'autres régions du génome viral pourraient être impliquées. De plus amples études moléculaires sur la résistance du VHC au traitement seront cruciales afin de mieux comprendre les stratégies de persistance adoptées par le virus.

La situation actuelle est telle que l'administration de l'interféron alpha pégylé, seul ou en association avec de la ribavirine, pour le traitement de l'infection par le VHC représente un fardeau économique pour le Canada. En effet, les recherches indiquent que les coûts directs et indirects (performance réduite au travail, absentéisme et effets du traitement) sont élevés et qu'ils augmentent rapidement pour un régime de traitement. Les coûts individuels associés au traitement peuvent s'avérer tout aussi significatifs. De plus, la bithérapie n'est pas efficace chez tous les patients et elle est associée à des effets secondaires graves. De là provient notre intérêt à investiguer la présence de marqueurs de résistance du VHC au traitement combinant l'interféron alpha pégylé et la ribavirine afin de développer des outils diagnostiques permettant de prédire le succès d'un régime thérapeutique.

Introduction

L'historique du virus

Suivant le développement de tests diagnostiques pour les virus de l'hépatite A et B au courant des années 1970, un nouvel agent à diffusion hématogène fut reconnu comme étant la principale cause des hépatites post-transfusionnelles. Jusqu'alors connu sous le nom d'hépatite non-A non-B, le virus de l'hépatite C (VHC) a été découvert en 1989 par Michael Houghton et ses associés (Chiron Corporation, Emeryville, Californie, États-Unis) suite au clonage d'ADNc viral extrait du plasma d'un chimpanzé infecté expérimentalement en laboratoire (Alter H., 1999; Choo *et al.* 1989; Choo *et al.* 1991). L'identification de ce pathogène a mené au développement du premier test sérologique (EIA-1) pouvant détecter, chez les sujets infectés, la présence d'anticorps circulants dirigés contre les protéines du VHC. L'avènement des techniques d'ELISA de 2^e et 3^e génération, entre 1992 et 1996, a eu un impact majeur sur l'efficacité du dépistage des donneurs de sang infectés, permettant aujourd'hui d'éliminer virtuellement le risque résiduel de contamination par transfusion sanguine (Alter H., 1999).

Épidémiologie et modes de transmission du VHC

L'infection par le VHC apparaît clairement comme un problème majeur de santé publique dans le monde. À ce jour, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 170 millions d'individus sont chroniquement infectés par le virus, ce qui représente plus de 3% de la population du globe (Anonymous, 1997; Anonymous, 1999). Plusieurs facteurs démographiques, dont la race ou le groupe ethnique, le statut économique, le statut matrimonial et le niveau d'éducation, sont à l'origine des fluctuations du degré de prévalence de l'infection par le VHC observées entre les différentes régions du monde (Alter M.J. *et al.* 1999). Les pays industrialisés ont une prévalence pour les anticorps anti-VHC variant entre 0-2,4%, tandis que certains pays de l'Europe de l'est et de l'Afrique ont un niveau beaucoup plus élevé d'infection (2,5% à $\geq 10\%$). Il semble que l'Égypte soit le pays le plus durement touché par le VHC, avec une prévalence de l'infection atteignant 20% de la population du

pays (Figure 1, p. 2). Au Canada, on estime que la prévalence de cas d'infection à VHC est de 0,8% de la population canadienne, soit 240 000 personnes (Anonymous, 1997; Zou *et al.* 2000; Zou *et al.* 2001).

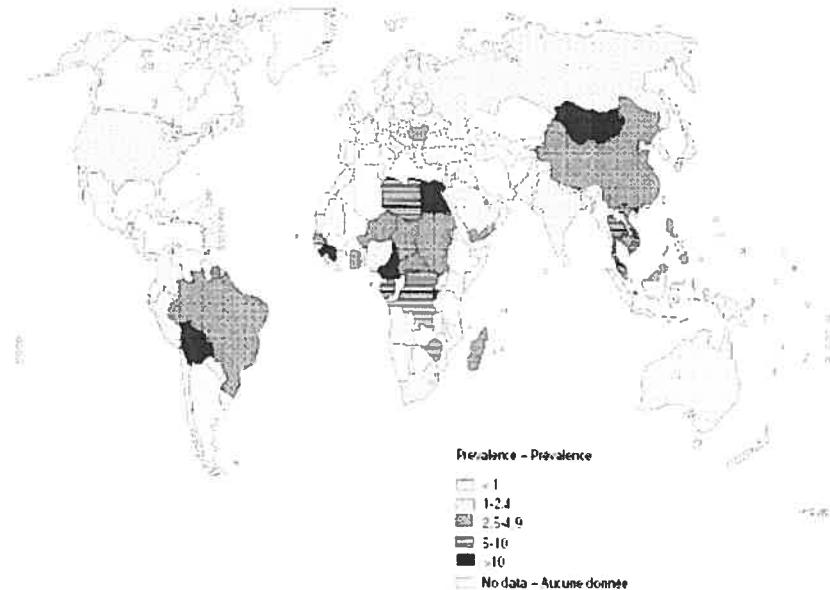


Figure 1 : Prévalence globale de l'infection par le VHC, juin 1999 (Tirée de : OMS, 2000)

Il est bien établi que la transmission du VHC est essentiellement parentérale, résultant de la mise en contact direct du sang d'un sujet indemne avec le sang d'un sujet infecté de façon persistante (Figure 2, p. 4).

- a. *La transfusion de produits sanguins*: Elle a été la première cause reconnue de transmission du VHC et a joué un rôle majeur dans la diffusion de l'infection jusqu'en 1990, où l'élimination des unités de sang contenant des anticorps anti-VHC ainsi que la sélection clinique stricte des donneurs ont permis de réduire considérablement le risque d'hépatites post-transfusionnelles (Alter H.J. *et al.* 1989; Kleinman *et al.* 1992). Santé Canada estime que 90 000 à 160 000 Canadiennes et Canadiens ont été infectés, entre 1960 et 1992, par le biais de sang ou de produits sanguins contaminés par le VHC. Les hémophiles et les dialysés étaient particulièrement à risque pour cette infection, mais depuis la mise en place d'un test de dépistage systématique des unités de sang, le risque a été réduit de façon substantielle, soit de 1 sur 500 000 unités (Cranston, 2000).

- b. *La toxicomanie intraveineuse* : Associée à plus de 60% des nouveaux cas d'infection déclarés entre 1999 et 2001, l'utilisation de drogues injectables constitue le principal vecteur de transmission du VHC au Canada (Figure 2, p. 4). Le virus se transmet par le sang contaminé qui se propage lorsqu'il y a partage des seringues lors de premières injections ou au sein d'établissements carcéraux, mais également lors du partage de matériel nécessaire aux injections (filtre, cuillère). La diffusion du VHC semble également possible chez les toxicomanes n'utilisant pas la voie intraveineuse, mais plutôt la voie intranasale. Le partage de la paille utilisée pour inhaler des drogues, associé à la présence de lésions de la muqueuse nasale chez les toxicomanes infectés, pourrait expliquer ce processus de contamination (Alter M.J. *et al.* 1999; Conry-Cantilena *et al.* 1996; Roudot-Thoraval, 1998).
- c. *La contamination nosocomiale* : Elle relève essentiellement de l'utilisation du matériel médical mal désinfecté lors d'une chirurgie, de soins dentaires, etc. La transmission iatrogène du virus peut également survenir lors de transfusions sanguines per-opératoires ou d'autres produits sanguins en milieu hospitalier.
- d. *Transmission familiale* : Le risque de transmission par contact sexuel est relativement faible; l'ARN du VHC n'a pas été observé dans les sécrétions vaginales et sa présence dans le sperme est inconstante. Toutefois, les personnes qui ont plusieurs partenaires sexuels sont davantage à risque (Sanchez-Quijano *et al.* 1990). Considéré comme un facteur de risque possible, mais plutôt faible, la transmission du virus entre sujets habitant sous le même toit pourrait être liée au partage d'objets de toilette ayant provoqué de petites plaies, par exemples une brosse à dent, un rasoir, etc.
- e. *L'exposition professionnelle* : Associée à une blessure accidentelle engendrée par l'usage de matériel souillé, l'exposition professionnelle apparaît comme un mode de transmission mineur du VHC. La prévalence de la maladie n'est actuellement pas plus élevée que dans la population en général (Zou *et al.* 2000).
- f. *Transmission verticale* : La transmission de la mère à l'enfant a été clairement démontrée, mais demeure un risque relativement faible, soit dans moins de 5% des cas au Canada (Association canadienne pour l'étude du foie, 2000). Toutefois, ce pourcentage tend à augmenter lorsque la charge virale de la mère est élevée et lorsque

cette dernière est co-infectée par le VIH (Association canadienne pour l'étude du foie, 2004; Giovannini *et al.* 1990; Lin H.H. *et al.* 1994; Ohto *et al.* 1994). L'allaitement n'apparaît pas comme un risque supplémentaire de transmission du VHC et, par conséquent, n'est pas contre-indiqué aux femmes infectées.

- g. *Procédures percutanées non stériles* : Le tatouage, le perçage corporel, l'acupuncture et l'électrolyse sont des pratiques considérées à risque pour la transmission du VHC puisque les instruments utilisés à ces fins sont en contact direct avec le sang des clients ayant recours à ces services (Alter M.J. *et al.* 1990; Ko Y.C. *et al.* 1992; Zou *et al.* 2000).

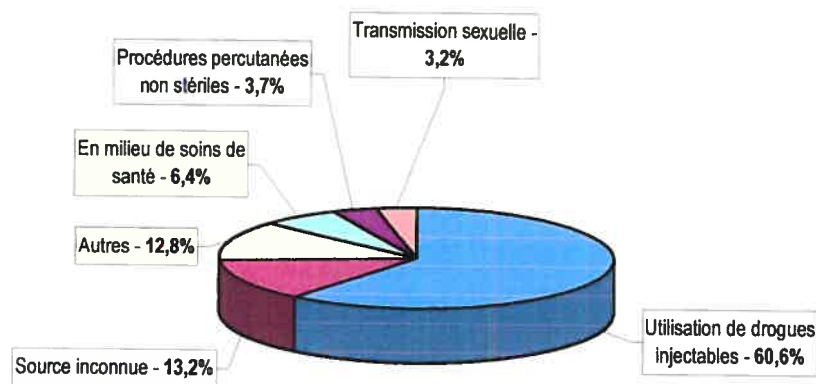


Figure 2 : Principaux facteurs de risque dans le cas d'hépatite C aiguë, 1999-2001
(Données tirées de : Programme de prévention, de soutien et de recherche pour l'hépatite C, Santé Canada, 2003)

Pathogénèse et manifestations cliniques

Atteintes hépatiques

a. *L'hépatite aiguë*

L'hépatite aiguë est caractérisée par l'inflammation du foie en absence de symptômes cliniques apparents, par une élévation modérée de l'alanine transaminase (ALT) et par la production d'anticorps anti-VHC. La période d'incubation du virus, soit le laps de temps entre l'exposition initiale au pathogène et l'apparition des premiers

symptômes combinée à un premier pic d'élévation de l'ALT sérique, varie entre 6 et 8 semaines (Figure 3, p. 5) (Alter H.J. *et al.* 1989; Barrera *et al.* 1995). Seulement 20% des patients infectés sont incommodés par des symptômes tels que des malaises, nausées et vomissements, fièvre, anorexie, coloration foncée des urines et douleurs abdominales (surtout dans le quadrant supérieur droit). De plus, le développement d'une jaunisse ne survient que dans moins de 10% des cas. La phase symptomatique, ainsi que l'augmentation répétée du niveau d'ALT sérique, tendent à se résorber entre 2 à 12 semaines suivant la primo-infection. La clairance du virus, survenant chez seulement 20% des patients, est associée à la disparition de l'ARN viral du sérum et à la guérison de l'infection primaire (Alter, M.J. *et al.* 1990; Farci *et al.* 1991).

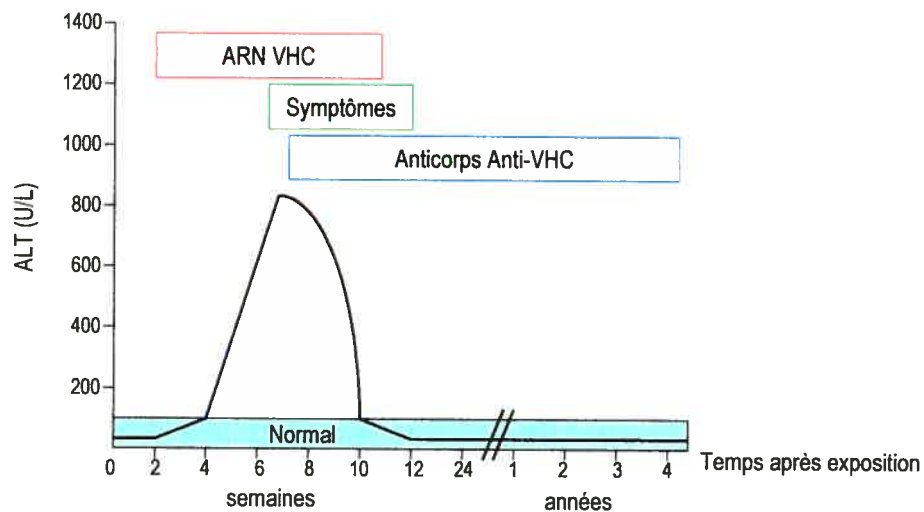


Figure 3 : Représentation schématisée de la réponse clinique suivant l'infection aiguë par le VHC

b. L'hépatite chronique

Les conséquences majeures de l'infection par le VHC sont associées à la progression vers la chronicité, survenant dans plus de 80% des cas (Koziel *et al.* 1993). La persistance de l'infection par le VHC est caractérisée par la détection d'ARN viral au moins 6 mois suivant l'infection aiguë, par l'absence de symptômes cliniques apparents, et par des fluctuations intermittentes ou persistantes des niveaux d'ALT sériques (Figure 4, p. 6) (Alter H.J. *et al.* 1989; Barrera *et al.* 1995; Farci *et al.* 1991). De plus, le foie subit des lésions histologiques importantes, dont la perte de cellules hépatiques et l'apparition

de tissu cicatriciel désordonné (Morales *et al.* 1995). La fibrose, remplaçant le tissu hépatique d'origine par du tissu cicatriciel fibreux dépourvu de l'architecture vasculaire et cellulaire naturelle, est un élément précurseur de la cirrhose hépatique. Près de 20% des patients infectés chroniquement par le VHC progressent vers la cirrhose (NIH consensus development conference statement, 2002; Seeff, 1999). Plusieurs facteurs sont associés à la susceptibilité de développer une cirrhose, dont l'âge (> 40 ans), le sexe (masculin), la consommation accrue d'alcool et la sévérité des lésions hépatiques. Les complications engendrées par la maladie hépatique chronique, dont l'insuffisance hépatique et le carcinome hépatocellulaire, surviennent chez approximativement 25% des patients cirrhotiques (Di Bisceglie A.M. *et al.* 1991). Ainsi, l'hépatite C est maintenant considéré comme étant la cause majeure de maladies hépatiques nécessitant une transplantation hépatique (Figure 5, p.7).

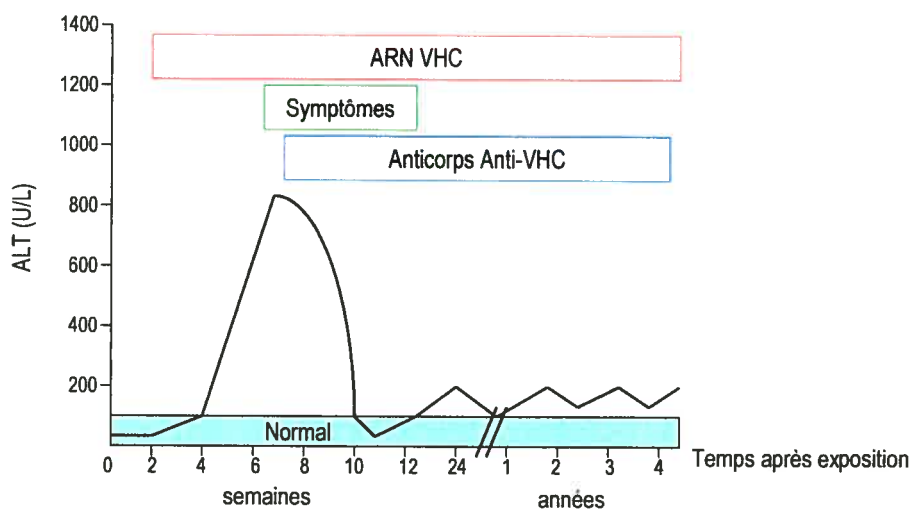


Figure 4 : Représentation schématisée de la réponse clinique suivant l'infection chronique à VHC

Atteintes extra-hépatiques

De nombreux symptômes extra-hépatiques, liés essentiellement à la perturbation du système immunitaire (syndromes auto-immuns), sont associés à l'infection chronique par le VHC : cryoglobuline mixte, glomérulonéphrite, purpura thrombopénique idiopathique, syndrome de Goujerot-Sjögren, périartérite noueuse (vasculite), lymphopathies (lymphome non hodgkinien) et thyroïdites (Di Bisceglie A.M. *et al.* 1991).

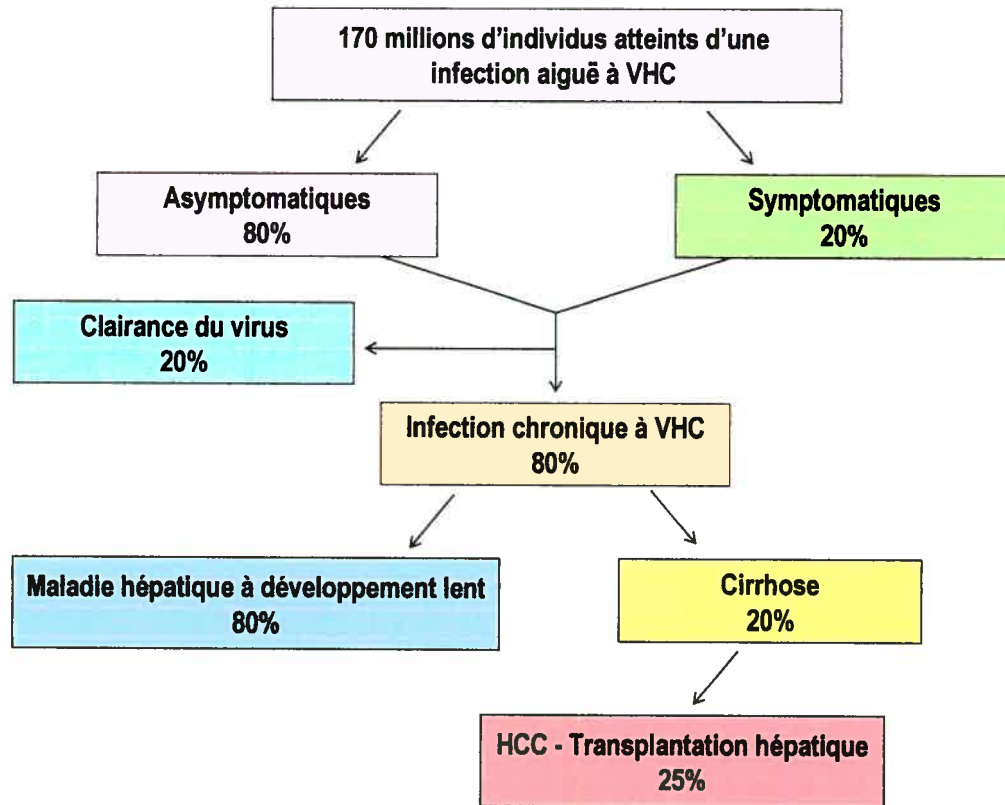


Figure 5 : Représentation schématisée des conséquences de l'infection par le virus de l'hépatite C

Tests diagnostiques actuels

A. Tests de dépistage des anticorps anti-VHC

Initialement, l'infection par le VHC est diagnostiquée par la présence d'Ac anti-VHC dans le sérum de sujets infectés. Plusieurs méthodes sérologiques très sensibles, soient les techniques de dosages immunoenzymatiques (EIA ou ELISA), sont utilisées pour la mise en évidence d'Ac anti-VHC dirigés contre des antigènes recombinants structuraux (protéine de la capsid) et non structuraux (protéines NS2, NS3/4 et NS5) dotés d'épitopes fortement antigéniques. Actuellement, les tests ELISA de 3^e génération, ayant une spécificité et une sensibilité supérieures à 99,7%, sont utilisés pour le dépistage de donneurs de sang afin de prévenir la transmission du VHC dans la population (Busch *et al.* 1994). Toutefois, chez les sujets à faible risque d'infection par le VHC, notamment les donneurs volontaires de sang, le pourcentage de résultats faussement positifs peut être aussi élevé que 50% à 60% (Fried, 1999). Ainsi, la validité des résultats obtenus par EIA

ou ELISA est assurée par d'autres analyses supplémentaires, dont la méthode d'immunobavardage recombinante (RIBA®, Chiron corporation), qui consiste à détecter les anticorps pouvant réagir avec chacune des protéines du VHC préalablement disposées sur une membrane de nitrocellulose. Cette méthode est toutefois peu utilisée puisqu'elle est coûteuse et l'interprétation des résultats est parfois délicate (Association canadienne pour l'étude du foie, 2000; Di Bisceglie A.M. *et al.* 1991; Fried, 1999).

L'inconvénient majeur de ces tests sérologiques est l'obtention de résultats faussement négatifs, par l'absence d'anticorps circulants, lors de la phase précoce de l'infection aiguë à VHC ou chez des sujets immunodéprimés. Par conséquent, il est préconisé de procéder à la détection directe de l'ARN viral par la technique de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) chez les sujets anti-VHC négatifs, mais à risque d'une infection (Fried, 1999).

B. Épreuves de dépistage de l'ARN du VHC

À la lumière des limites que comportent les diverses méthodes de détection des Ac anti-VHC, il est souvent nécessaire de procéder à la détection directe de l'ARN du VHC dans le sérum, notamment chez les patients qui sont à la fois positifs pour les anticorps dirigés contre le VHC et qui ont des taux d'ALT normaux (Tableau I, p. 9). Le génome viral doit être amplifié par la méthode de PCR précédée d'une étape de transcription inverse de l'ARN (RT). Il y a deux types de dosages de l'ARN du VHC :

- ▲ *Dosages qualitatifs* : La surveillance qualitative de l'ARN du VHC permet de confirmer un résultat sérologique incertain préalablement obtenu par les techniques RIBA® ou ELISA, sert à établir un diagnostic précoce de l'hépatite aiguë (mise en évidence de la réplication virale), au monitoring de la transmission verticale et à l'évaluation de la réponse thérapeutique. L'obtention d'un résultat négatif par PCR indique que le virus est éliminé du sérum, mais ne donne aucune information quant à l'état du VHC dans le foie ou à d'autres sites privilégiés de réplication du virus tels que les lymphocytes (Association canadienne pour l'étude du foie, 2000).

- ▲ *Dosages quantitatifs* : L'épreuve quantitative de dépistage de l'ARN du VHC, indiquant la concentration ou la charge virale du virus, n'est utilisée que dans le cadre du bilan pré-thérapeutique et au cours du suivi thérapeutique (Association canadienne pour l'étude du foie, 2000).

Tableau I : Interprétation des résultats de l'épreuve de dépistage de l'ARN du VHC chez les patients anti-VHC positifs (Tiré de : Association canadienne pour l'étude du foie de 1999, 2000)

Concentration ALT	Résultat ARN VHC	Interprétation
Normale	Positif	- Patient infecté, hépatopathie impossible à détecter
Normale	Négatif	- Anti-VHC faussement positif - Clairance virale spontanée - ARN du VHC faussement négatif - Infection dormante et hépatopathie minime ou nulle
Élevée	Positif	- Sujet infecté par une hépatopathie active
Élevée	Négatif	- Faussement positif - Clairance virale spontanée - ARN du VHC faussement négatif - Infection dormante par l'hépatite C, mais l'hépatopathie est attribuable à une autre cause

C. Monitoring du VHC

1. *Alanine transaminase*

Une des enzymes du foie, soit l'alanine transaminase (ALT), est présente en forte concentration dans les hépatocytes et a un rôle important dans l'entreposage des protéines. Couramment utilisée pour le monitoring des patients infectés par le VHC, cette enzyme est relâchée dans le sang lorsque le foie subit des dommages hépatocellulaires. Il y a plusieurs causes potentielles reliées à l'élévation de l'ALT sérique, dont l'ingestion accrue d'alcool, l'usage de drogues, l'hépatite virale et certaines maladies métaboliques. De plus, l'augmentation du niveau d'ALT sérique peut également survenir suite au dommage de d'autres organes tels que le cœur, les muscles, le cerveau et les reins. Par conséquent, l'élévation du pic d'ALT sérique n'est pas nécessairement associée à l'activité nécroinflammatoire, à la fibrose ou à la cirrhose du foie.

2. *Biopsie du foie*

La biopsie hépatique demeure un examen médical irremplaçable pour la prise en charge des patients infectés de façon persistante par le VHC. Consistant à prélever un échantillon tissulaire du foie et à y analyser l'histologie des cellules et tissus sous microscope, elle seule permet de déterminer le degré d'activité nécrotique et inflammatoire (grade de l'hépatite) ainsi que la quantité de fibrose présente dans le foie (stade de l'hépatite). De ce fait, la prise de connaissance du degré d'activité de la maladie hépatique, par le biais de la biopsie, sert à établir un pronostic précis et à orienter les patients vers un traitement antiviral adéquat (Ishak *et al.* 1995).

2.1. Biologie du foie

Le foie, localisé dans le coin supérieur droit de l'abdomen, est la glande la plus large de l'organisme. Il est divisé en deux lobes principaux qui se subdivisent, de par la distribution des vaisseaux sanguins, en huit segments totaux. Les lobes du foie comprennent un grand nombre d'unités fonctionnelles appelées lobules hépatiques, qui sont constituées de cellules épithéliales spécialisées (hépatocytes) séparées par de larges canaux vasculaires, soient les sinusoides. Le lobule hépatique, de forme hexagonale, est centré par une veinule hépatique terminale (veinule centrolobulaire) et dispose de septums fibreux appelés espaces portes, à chacune de ses extrémités, dans lesquels cheminent les ramifications de l'artère hépatique, de la veine porte et des conduits biliaires. Issu des branches terminales de la veine porte et de l'artère hépatique, le flux sanguin circule dans les sinusoides, à l'intérieur desquels il entre en contact étroit avec les hépatocytes pour l'échange de nutriments et d'oxygène. Le sang atteint ensuite les branches de la veine hépatique terminale avant de rejoindre la veine cave inférieure (Piñeiro-Carrero V.M. et Piñeiro E.O., 2004).

Considéré comme l'unité structurale du foie, l'acinus hépatique est centré par un espace porte dans lequel le sang s'écoule vers les veinules hépatiques terminales à travers les sinusoides. L'acinus est divisé en trois zones dans lesquelles se trouvent des hépatocytes ayant des fonctions métaboliques différentes. Adjacente à l'espace porte, la zone 1 est perfusée par le sang le plus

oxygéné, tandis que la zone 3, la plus éloignée du flux sanguin, est moins oxygénée et, par conséquent, plus sujette à l'ischémie (Piñeiro-Carrero V.M. et Piñeiro E.O., 2004).

2.2. Grade et stade histologique de l'hépatite chronique

Le concept d'évaluation de l'hépatite chronique consiste à définir deux scores distincts, basés sur un index numérique de l'activité histologique du foie, afin de fournir aux cliniciens des informations sur la sévérité et la progression de la maladie hépatique essentielles à la prise en charge adéquate des patients. Le grade permet d'évaluer l'intensité de l'activité nécroinflammatoire de l'hépatite chronique; il représente l'activité de la réponse immunitaire initiée contre le virus (infiltration portale, périportale et intra-acinaire de cellules inflammatoires, variété de dommages hépatocellulaires et nécrose) (Tableau II, p. 12). En tentant d'éliminer le virus du foie par induction d'une réponse inflammatoire, le système immunitaire engendre des dommages aux hépatocytes, mais ceux-ci sont dotés d'un pouvoir de guérison par régénération, cicatrisation et fibrose (Ishak *et al.* 1995). Le stade mesure le degré de fibrose ainsi que l'altération architecturale du foie; il représente la progression morphologique de la maladie (Tableau III, p. 12). La présence de fibrose hépatique est le meilleur facteur prédictif du développement potentiel d'une cirrhose. Ainsi, les informations histologiques issues de l'analyse microscopique de spécimens de biopsie hépatique peuvent influencer la prise en charge des patients par les cliniciens. Toutefois, le pronostic de l'hépatite chronique ne peut être déterminé sans faire référence à l'étiologie de la maladie, au statut de réplication viral et du système immunitaire, à la réponse au traitement et à la présence ou absence de co-infection (Ishak *et al.* 1995).

En clinique, l'obtention d'un score supérieur ou égal à $\frac{3}{6}$ (stade d'Ishak), définissant le degré de fibrose de modéré à sévère, constitue l'un des critères déterminants de l'initiation d'un régime thérapeutique strict. Toutefois, certains patients désireux d'entreprendre la thérapie antivirale et ce, malgré un faible degré de fibrose hépatique, peuvent également être traités.

Tableau II : Modification de l'index de l'activité histologique (HAI) pour le grade: scores
nécroinflammatoires (Tiré de : Ishak *et al.* 1995)

	Score
A. Nécrose désordonnée aux interfaces périportales ou périséptums	
- Absente	0
- Minimale (focal, quelques espaces portes)	1
- Minimale/Modérée (focal, majorité des espaces portes)	2
- Modérée (continue autour de < 50% des septums et espaces portes)	3
- Sévère (continue autour de > 50% des septums et espaces portes)	4
B. Nécrose confluyente	
- Absente	0
- Nécrose confluyente focale	1
- Nécrose de certaines aires de la zone 3	2
- Nécrose de la majorité des aires de la zone 3	3
- Nécrose de la zone 3 + formation occasionnelle de ponts nécrotiques portals-centraux (P-C)*	4
- Nécrose de la zone 3 + formation de multiples ponts nécrotiques portals-centraux (P-C)	5
- Nécrose multiacinaire et paracinaire	6
C. Nécrose lytique focale, apoptose et inflammation focale	
- Absente	0
- Un foyer ou moins par objectif 10X	1
- Deux à quatre foyers par objectif 10X	2
- Cinq à dix foyers par objectif 10X	3
- Plus de dix foyers par objectif 10X	4
D. Inflammation portale	
- Aucune	0
- Minimale, peu ou l'ensemble des espaces portes	1
- Modérée, peu ou l'ensemble des espaces portes	2
- Modérée/Significative, l'ensemble des espaces portes	3
- Significative, l'ensemble des espaces portes	4

*P-C : ponts nécrotiques formés entre les espaces portes (P) et les veinules hépatiques terminales (C), désignés sous le terme ponts nécrotiques portals-centraux (P-C).

Tableau III : Évaluation modifiée pour le stade : changements architecturaux, fibrose et cirrhose (Tiré de : Ishak *et al.* 1995)

Modifications de l'architecture du foie	Score
- Absence de fibrose	0
- Expansion de fibrose dans quelques espaces portes, avec ou sans septums fibreux	1
- Expansion de fibrose dans la majorité des espaces portes, avec ou sans septums fibreux	2
- Expansion de fibrose dans la majorité des espaces portes, avec formation occasionnelle de ponts fibreux entre les espaces portes (P-P)	3
- Expansion de fibrose dans les espaces portes, avec formation de ponts fibreux (P-P) et (P-C)	4
- Ponts fibreux (P-P et/ou P-C) avec présence occasionnelle de nodules (cirrhose incomplète)	5
- Cirrhose (probable ou définie)	6

Taxonomie du VHC

Le VHC appartient au genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Les particules virales ont un diamètre de 55 à 65 nm et sont enveloppées d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées deux glycoprotéines d'enveloppe virales, E1 et E2, organisées en complexes hétérodimériques non covalents (Figure 6, p. 13) (He *et al.* 1987). Le génome du VHC, entouré d'une capsidie icosaédrique comportant 32 capsomères, consiste en une molécule d'ARN monocaténaire linéaire de polarité positive hétérogène d'environ 9,600 nucléotides (Choo *et al.* 1991).

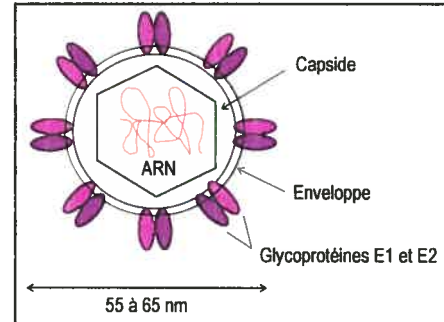


Figure 6: Structure du VHC

Nomenclature et génotypes

L'évolution phylogénétique du VHC résulte de l'introduction aléatoire de substitutions nucléotidiques par l'ARN polymérase ARN dépendante virale, à une fréquence annuelle de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} par position nucléotidique, au cours du cycle de multiplication viral (Anonymous, 1999; Davis, 1999). Par conséquent, l'accumulation d'erreurs de réplication entraîne un degré d'hétérogénéité génétique important dans la totalité du génome viral, subdivisant le VHC en six génotypes majeurs (1 à 6), au sein desquels se trouvent environ 70 sous-types différents (a, b, c, etc.) (Simmonds *et al.* 2005). Représentant la distance moléculaire entre

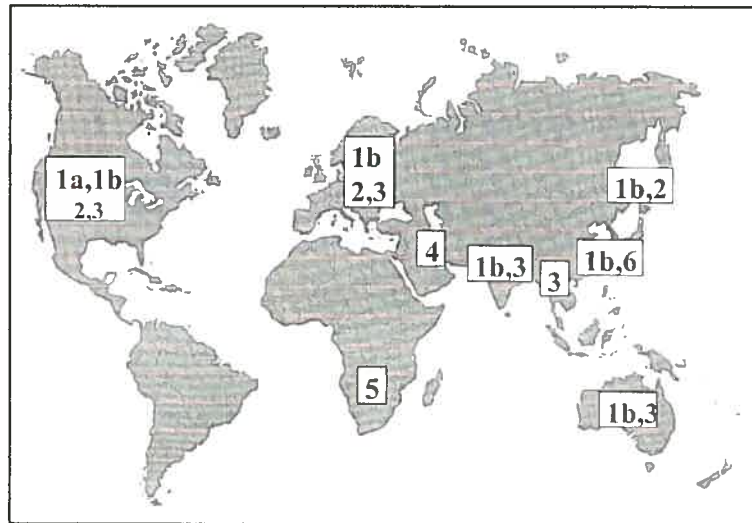


Figure 7 : Distribution mondiale des génotypes du VHC
(Tirée de : Davis, 1999)

les différents isolats du VHC, les génotypes ont une distribution différentielle entre les pays

(Figure 7, p. 13) : les génotypes 1, 2 et 3 sont répartis à travers l'ensemble du globe, tandis que les génotypes 4 et 5 sont retrouvés principalement en Afrique et le génotype 6 est localisé majoritairement en Asie (Davis, 1999; Robertson *et al.* 1998).

La diversification rapide des sous-types prédominants au Canada et aux États-unis est le résultat de la diffusion planétaire de ces variants au cours des cent dernières années, principalement par le biais de la transfusion de sang et de produits dérivés pour le génotype 1b et par la toxicomanie intraveineuse pour les génotypes 1a et 3a. L'évolution génétique du sous-type 1b semble aujourd'hui ralentir puisque le dépistage systématique des unités de sang a considérablement freiné la propagation de ce génotype. Toutefois, la fréquence élevée de diffusion du VHC liée à l'usage de drogues injectables est associée à l'évolution rapide des génotypes 1a et 3a (Pawlotsky *et al.* 1995; Pybus *et al.* 2001).

Structure et organisation du génome viral

Le génome du VHC, riche en G-C, comporte un cadre de lecture ouvert (ORF) flanqué par deux régions non codantes (NC) très conservées, 5'NC et 3'NC, qui jouent un rôle essentiel dans la réplication.

A. Région 5' non codante (IRES)

La région 5'NC, constituée des 341 premiers nucléotides du génome viral, est formée de quatre domaines riches en structures tiges-boucles (I, II, III et IV) et d'un pseudo-nœud (Figure 8, p. 14). Dotée d'une structure secondaire complexe, l'extrémité 5' contient des éléments de régulation importants pour la réplication et l'expression des gènes viraux. Le site interne d'entrée du ribosome (IRES), formé par les domaines II, III et IV, est une structure qui fixe la sous-unité 40S du ribosome à proximité du codon d'initiation AUG (situé dans le domaine IV) afin d'amorcer la traduction coiffe indépendante du cadre de lecture ouvert (ORF) du VHC (Honda *et al.* 1999; Tsukiyama-Kohara *et al.* 1992).

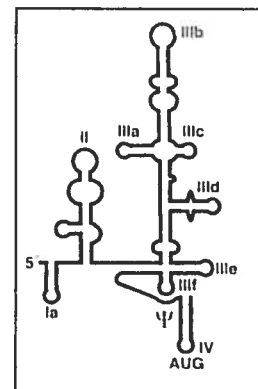


Figure 8 : IRES du VHC
(Tirée de : Honda *et al.* 1999)

B. Cadre de lecture ouvert (ORF)

L'ORF débute par un codon AUG initiateur de la traduction situé dans le domaine IV de la région 5' non codante du génome viral. Il comporte 9024 à 9111 nucléotides et code pour une polyprotéine précurseur d'environ 3000 acides aminés dont la maturation post-traductionnelle donne naissance aux protéines virales structurales (capside, E1 et E2, p7) et non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Figure 11, p. 18) (Honda *et al.* 1999).

C. Région 3' non codante

La région 3'NC comporte trois régions successives, de 5' à 3' : (1) une région non traduite d'environ 30 nucléotides, variable d'un isolat à l'autre; (2) une région poly-U/C de longueur variable; (3) une région 3' terminale très conservée de 98 nucléotides, connue sous le nom de région X, repliée en trois tiges-boucles successives (Figure 9, p. 15). Celle-ci semble jouer un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif au cours de la réplication (Kolykhalov *et al.* 1996; Kolykhalov *et al.* 2000).

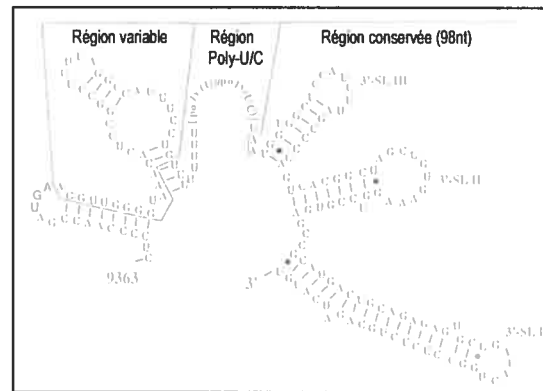


Figure 9: Structure 3'NC du VHC
(Tirée de: Kolykhalov *et al.* 1996)

Cycle cellulaire et réplication

En l'absence d'un système d'étude adéquat en culture cellulaire et d'un modèle animal convenable, les mécanismes moléculaires de réplication du virus de l'hépatite C sont établis principalement par analogie avec les *Flaviviridae* et par la caractérisation de protéines virales recombinantes du VHC. Le cycle de réplication du VHC se résume en quatre étapes (Figure 10, p. 16) :

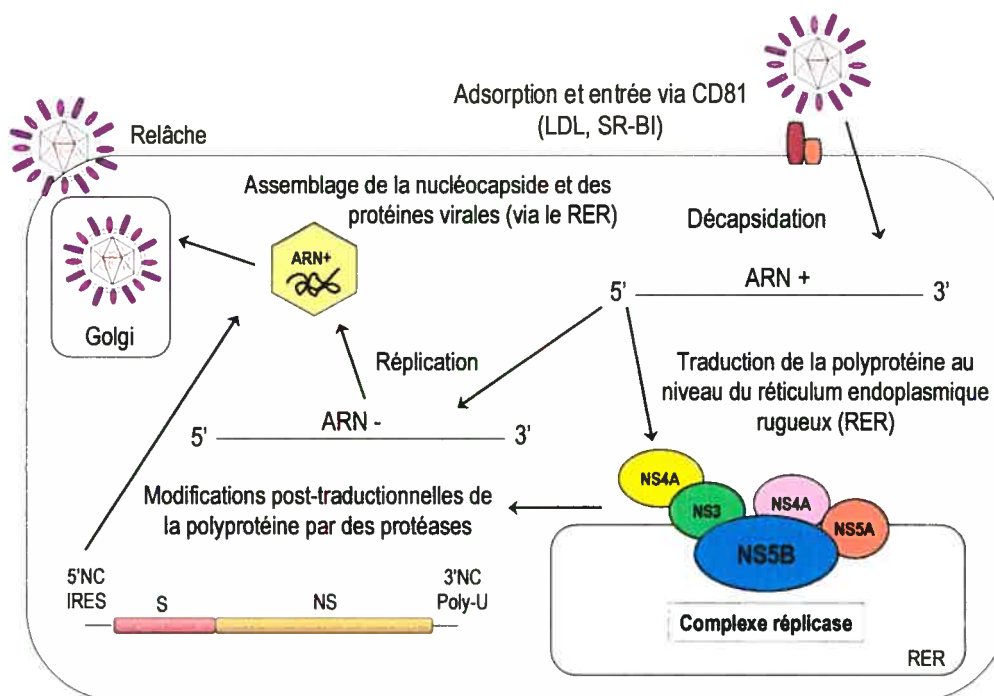


Figure 10 : Représentation du cycle de réplication du VHC

1. Adsorption et entrée

La première étape du cycle de multiplication du VHC est l'attachement d'une particule infectieuse à un récepteur de surface cellulaire de l'hôte via les glycoprotéines d'enveloppe virales. Deux récepteurs candidats ont d'abord été proposés : la tétraspanine CD81 et le récepteur des LDL (lipoprotéines de faible densité). Exprimé à la surface de la majorité des types cellulaires, dont les lymphocytes B, T et les hépatocytes, le récepteur CD81 semble capable de fixer spécifiquement la forme soluble de la glycoprotéine E2 recombinante *in vitro* (Pileri *et al.* 1998). En revanche, l'initiation d'une infection virale productive, par le biais de l'interaction avec le CD81 ou le récepteur LDL, n'a pas été décrite dans la littérature. Tout récemment, un polypeptide de 509 acides aminés, appartenant à la superfamille CD36, fut identifié comme récepteur candidat pour le virus de l'hépatite C. Présent à la surface d'hépatocytes humains HepG2 (n'exprimant pas le récepteur CD81), le récepteur phagocytaire humain de type B classe I (SR-BI) interagit avec la forme soluble de la glycoprotéine E2 recombinante et ce, indépendamment de la tétraspanine CD81, ce qui pourrait expliquer le tropisme hépatocellulaire du VHC (Roccasecca *et al.* 2003; Scarselli *et al.* 2002). Selon une étude récente menée par Lavillette *et al.* (2005), des pseudo particules

du VHC (VHCpp) arborant des glycoprotéines de surface provenant de différents génotypes/sous-types ont une capacité différentielle d'interaction avec le récepteur SR-BI. Ceci suggère que la stœchiométrie des molécules impliquées dans la formation d'un récepteur optimal d'entrée cellulaire et/ou le niveau d'expression requis du récepteur SR-BI pour promouvoir l'entrée des pseudo particules virales diffèrent entre génotypes, sous-types et isolats du VHC. De plus, il a été démontré que ces VHCpp pénètrent à l'intérieur de cellules Huh-7 par endocytose et requièrent l'acidification de vésicules endosomales afin d'activer les propriétés fusionnelles de leurs protéines de fusion (Lavillette *et al.* 2005).

Suite à la pénétration et à la décapsulation de la particule virale dans des compartiments acides de type endosomes, le génome viral est largué dans le cytoplasme où il joue le rôle d'ARN messenger pour la synthèse des protéines virales et de matrice pour la réplication virale.

2. Traduction et maturation de la polyprotéine

Comme mentionné précédemment, la traduction du messenger d'ARN n'est pas engendrée par un mécanisme dépendant d'une structure coiffe en 5' nécessaire au glissement du ribosome jusqu'au premier codon AUG initiateur, mais plutôt par l'activité d'un site interne d'entrée du ribosome (IRES) situé à proximité du codon AUG initiateur de la traduction du cadre de lecture ouvert (ORF) dans le domaine IV de la région 5' non codante du VHC. En présence de facteurs cellulaires, la sous-unité 40S du ribosome s'attache spécifiquement à l'IRES avec peu ou pas de glissement afin d'amorcer la synthèse du messenger d'ARN (Honda *et al.* 1999).

L'organisation et la maturation de la polyprotéine du VHC sont illustrées ci-dessous (Figure 11, p. 18). La polyprotéine précurseur est traduite au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RE) et clivée de façon co- et post-traductionnelle par trois protéases, dont l'une d'origine cellulaire et deux de source virale, ce qui donne naissance à dix protéines virales matures. La région structurale (C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2), située à l'extrémité 5' du génome viral, est clivée par une peptidase cellulaire située dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux. Les protéines non structurales sont relâchées de la polyprotéine précurseur par deux protéases virales : (1) la jonction NS2/NS3 est clivée par l'action auto-catalytique en *cis* de l'auto-protéase NS2-NS3, enzyme constituée par la partie

C-terminale de NS2 et la partie N-terminale de NS3; (2) la sérine protéase NS3, associée à son co-facteur NS4A, assure le clivage de l'ensemble des jonctions situées en aval : NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B (Dubuisson *et al.* 1994).

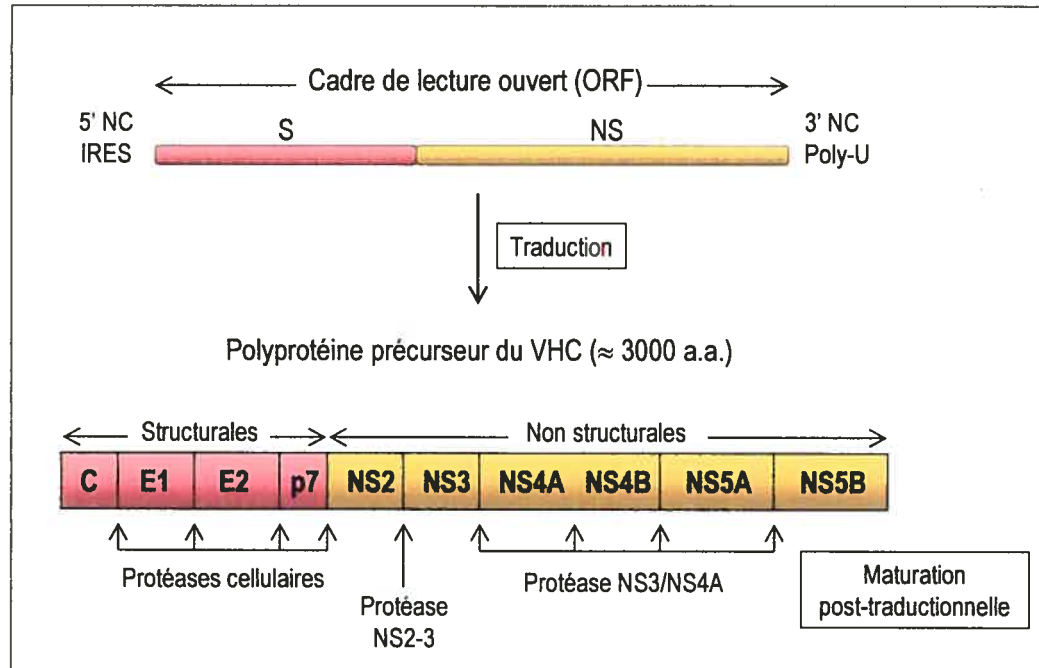


Figure 11 : Structure du génome VHC et maturation de la polyprotéine précurseur

3. Réplication

L'ARN polymérase ARN dépendante virale (NS5B), ainsi que l'ensemble des protéines non structurales du VHC (NS2, NS3, NS4A, NS4B et NS5A), s'associe à des protéines cellulaires de l'hôte afin de former le complexe de réplication (Figure 12, p. 19) (Dimitrova *et al.* 2003). Celui-ci, associé à des membranes intracellulaires péri-nucléaires, constitue le siège de la réplication virale. La formation d'un tel complexe, également en présence d'ARN génomique, est une caractéristique typique des virus à ARN de polarité positive et permet la synthèse simultanée de protéines virales et d'ARN génomique dans des compartiments distincts (Ishido *et al.* 1998). La réplication du VHC, régie par l'ARN polymérase ARN dépendante virale, a lieu à la surface de membranes cellulaires altérées dérivant du réticulum endoplasmique rugueux. À partir de l'ARN génomique, la polymérase virale synthétise un brin d'ARN négatif qui sert ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins d'ARN de polarité positive.

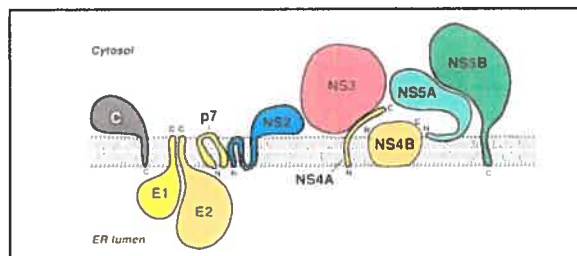


Figure 12 : Schéma illustrant l'association membranaire des protéines non structurales du VHC au réticulum endoplasmique

(Tirée de : Moradpour *et al.* 2003)

4. Assemblage et sortie

L'organisation des particules virales est possiblement déclenchée par l'interaction entre la protéine de la capsid et l'ARN génomique, ce qui permettrait au VHC d'amorcer l'assemblage spécifique de matrices d'ARN de polarité positive et de réprimer les mécanismes de traduction/réplication en faveur du processus d'empaquetage des virions. Par analogie avec les flavivirus, les nucléocapsides pourraient ensuite acquérir leur enveloppe par bourgeonnement à travers les membranes du réticulum endoplasmique, à la surface desquelles sont ancrées les glycoprotéines E1 et E2, et les particules virales ainsi formées seraient excrétées par exocytose (Cocquerel *et al.* 1999).

L'analyse détaillée du VHC fut longtemps entravée par l'absence d'un système en culture cellulaire. La transfection *in vitro* d'une souche JFH1 génotype 2a dans des cellules Huh7, clonée d'un individu atteint d'une hépatite fulminante, résultat en la sécrétion de particules virales infectieuses pour les cellules en culture (Huh7, hépatocytes humains et cellules non hépatiques) et le chimpanzé (Kato *et al.* 2003; Wakita *et al.* 2005; Zhong *et al.* 2005). Ainsi, ce système fournit un outil important pour l'étude du cycle de réplication du VHC et l'élaboration de stratégies antivirales.

Cinétique de réplication et tropisme cellulaire

Le virus de l'hépatite C pénètre dans la circulation sanguine et se fraie un chemin jusqu'au foie, site primaire de réplication du pathogène, afin de s'y multiplier. D'après divers travaux publiés dans la littérature, le VHC est non cytopathique. Par conséquent, la

pathogénèse hépatique semble directement liée à la réponse immunitaire pro-inflammatoire engendrée chez l'hôte infecté de façon persistante (Anonyme *et al.* 1999). L'infection chronique par le VHC est caractérisée par des cinétiques de réplication virale très rapides, avec un rapport production/clairance quotidien de l'ordre de 10^{12} particules virales, mais également par le maintien constant du pool d'hépatocytes infectés (Neumann *et al.* 1998).

Principalement hépatotropique, plusieurs études récentes suggèrent que le VHC est également en mesure de se répliquer dans des lignées cellulaires d'origine lymphoïdes, précisément dans certaines sous populations lymphocytaires B et dans les cellules dendritiques, ce qui suggère l'existence de réservoirs extra-hépatiques du VHC au cours de l'infection chronique (Cormier *et al.* 2004; Lerat *et al.* 1998; Roque Afonso *et al.* 1999). Le tropisme cellulaire du VHC reflète la capacité de certains variants à se fixer spécifiquement à différents types cellulaires, d'être internalisés et de se répliquer dans ces cellules. La reconnaissance de ces variants dans différents compartiments de l'organisme dépend de molécules spécifiques présentes à la surface de ces cellules permissives. Comme mentionné précédemment, plusieurs récepteurs potentiels d'entrée du VHC ont été proposés, dont les glycosaminoglycanes, le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL) et le récepteur phagocytaire de type B classe I, mais le CD81 est celui qui a été le plus caractérisé (Cormier *et al.* 2004).

Récepteur CD81

Faisant partie de la superfamille des tétraspanines, la molécule CD81 (TAPA-1) est une protéine membranaire de 26 kDa caractérisée par la présence de quatre domaines transmembranaires (Figure 13, p. 20), trois boucles intracellulaires et deux domaines extracellulaires (SEL : petite boucle; LEL : large boucle) (Andria *et al.* 1991; Drummer *et al.* 2002; Higginbottom *et al.* 2000). Plusieurs groupes ont démontré que le CD81 humain interagit avec la forme soluble recombinante de la glycoprotéine E2, le complexe hétérodimérique E1/E2, les particules virales non infectieuses du VHC ainsi que celles provenant d'échantillons

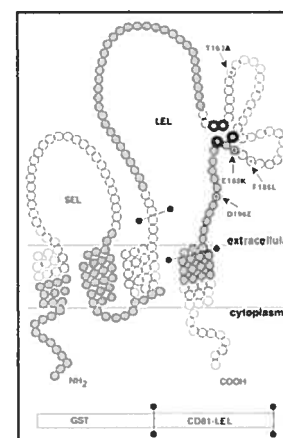


Figure 13: Structure du CD81
(Tirée de : Higginbottom *et al.* 2000)

de plasma infectieux, suggérant que CD81 jouerait un rôle dans le mécanisme d'internalisation du VHC (Flint *et al.* 1999; Higginbottom *et al.* 2000; Pileri *et al.* 1998). D'ailleurs, les résidus aminés essentiels à l'interaction avec la glycoprotéine E2 ont été localisés dans la 2^e boucle extracellulaire (LEL) du récepteur CD81 (Drummer *et al.* 2002; Higginbottom *et al.* 2000). Étant exprimé à la surface de la majorité des cellules humaines, à l'exception des érythrocytes et des plaquettes, CD81 ne peut toutefois pas restreindre le tropisme cellulaire du VHC aux hépatocytes et à certains lymphocytes (Cormier *et al.* 2004). De récents travaux ont indiqué que l'expression unique de CD81 ne suffit pas à conférer la susceptibilité à l'infection et que, par conséquent, celle-ci fonctionnerait possiblement à titre de co-récepteur pour l'adsorption et la pénétration du VHC (Cormier *et al.* 2004; Lavillette *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2004).

Protéines virales

Capside

La maturation post-traductionnelle de la polyprotéine du VHC donne naissance à une phosphoprotéine immature très basique de 21 kDa qui est localisée principalement dans le cytoplasme, soit à proximité des membranes péri-nucléaires, à la surface de radeaux lipidiques ou associée aux membranes du réticulum endoplasmique (Hijikata *et al.* 1991; Hope R.G. et McLauchlan J., 2000). La protéine de la capsid, qui comporte un segment hydrophobe à son extrémité C-terminale, constitue les 191 premiers acides aminés en N-terminal de la polyprotéine virale. Elle est très conservée d'une souche virale à l'autre et fortement antigénique. Une forme tronquée de 19 kDa, résultant du clivage protéolytique de la portion hydrophobe en C-terminale via des peptidases cellulaires, correspond à la protéine C mature (174 a.a.). La présence de signaux de localisation nucléaire dans la portion N-terminale basique de la protéine C pourrait résulter en la translocation de celle-ci vers le noyau afin de moduler différents processus cellulaires, dont la transcription de gènes, la prolifération cellulaire, l'apoptose, le métabolisme des lipides et la signalisation cellulaire (Hussy *et al.* 1996; McLauchlan J., 2000). En somme, la protéine C semble jouer un rôle important dans la pathogenèse de l'infection à VHC.

Les mécanismes d'assemblage de la nucléocapside du VHC sont très peu connus. D'après certaines études réalisées à partir de protéines C recombinantes, il semble que le domaine fortement basique de 124 acides aminés en N-terminal de la protéine C, disposant de régions d'interaction avec l'ARN, soit essentiel et suffisant à l'assemblage de nucléocapsides *in vitro* (Kunkel *et al.* 2001).

Glycoprotéines E1 et E2

Les glycoprotéines E1 (gp31) et E2 (gp70), présentes à la surface des particules virales, sont deux protéines transmembranaires de type I fortement glycosylées; elles sont composées d'un ectodomaine N-terminal et d'un domaine hydrophobe transmembranaire en C-terminal impliqué dans la biogenèse des hétérodimères E1/E2. Assemblées dans le lumen du réticulum endoplasmique, les glycoprotéines hétérodimériques E1 et E2 sont constituées de protéines natives et stabilisées par des interactions non covalentes (Op De Beeck *et al.* 2000; Yagnik *et al.* 2000). Toutefois, celles-ci ont un rôle différent dans le processus d'entrée du VHC. E2 interagit avec les récepteurs cellulaires de surface de l'hôte, tandis que E1, de par la présence d'acides aminés hydrophobes serait, par analogie avec les peptides de fusion des paramyxovirus et des flavivirus, impliquée dans la fusion membranaire (Op De Beeck *et al.* 2000).

L'ectodomaine de la glycoprotéine E2 est formé d'une structure secondaire à faible contenu en feuillets β (37%) (Figure 14, p.23). Les 27 premiers acides aminés N-terminaux de E2, fortement exposés à la surface protéique, constituent la région la plus hétérogène du génome viral. Étant l'une des principales cibles des anticorps neutralisants anti-VHC, les épitopes antigéniques de la région hypervariable 1 (HVR1 : résidus 384-410 de la polyprotéine) sont soumis à de fortes pressions immunitaires, menant à la sélection de mutants pouvant échapper au système immunitaire de l'hôte (quasi-espèces) (Farci *et al.* 1994). Les sites de liaison au récepteur CD81, comprenant la région hypervariable 2 (HVR2 : résidus 474-482 de la polyprotéine), la région de liaison 1 (CD81-1 : résidus 474-494 de la polyprotéine) et la région de liaison 2 (CD81-2 : résidus 522-551 de la polyprotéine) sont très exposés à la surface du dimère E2 (Flint *et al.* 1999; Roccasecca *et al.* 2003; Yagnik *et al.* 2000). Le motif « WHY » (résidus 476-479 de la polyprotéine), présent dans la portion C-terminale de la région CD81-1, est très important dans l'association hétérodimérique entre E1

et E2 (Yi *et al.* 1997). Le modèle de Yagnik *et al.* (2000) présente une région chargée positivement entre les résidus 612-620 de la polyprotéine (PYRLWHYPC) qui est fortement similaire aux résidus 484-494 de la région CD81-1 (PYCWHYPPRPC), suggérant que les acides aminés 613-618 seraient impliqués dans la liaison de la tétraspanine CD81 et/ou dans la dimérisation E1/E2 ou E2/E2 (Roccasecca *et al.* 2003; Yagnik *et al.* 2000).

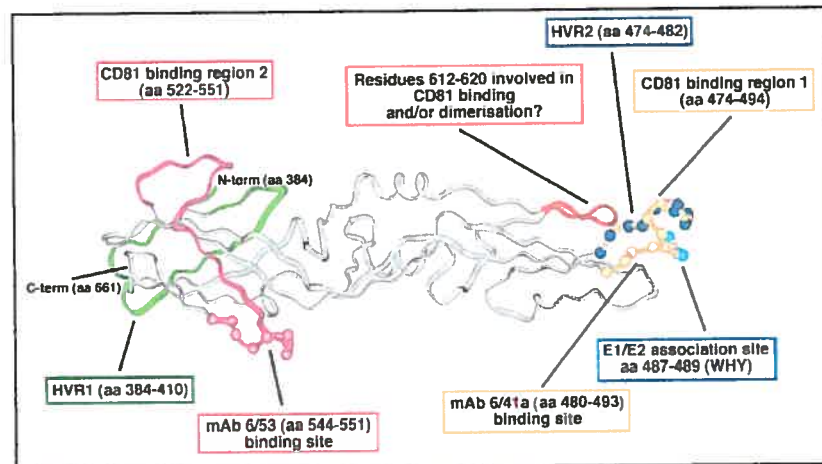


Figure 14 : Modèle de la glycoprotéine E2 du VHC
(Tirée de : Yagnik *et al.* 2000)

Une troisième région hypervariable (HVR3), localisée entre les résidus aminés 431 à 466, fut décrite récemment dans les travaux de Troesch *et al.* (2006). Un sous-domaine de la région HVR3, composé de résidus basiques très conservés, est soumis à de fortes pressions de sélection positives par le système immunitaire de l'hôte. L'ensemble des analyses effectuées suggère l'implication possible de la région HVR3 dans les processus d'adsorption et d'entrée cellulaire (Troesch *et al.* 2006).

p7

Le polypeptide de 63 acides aminés est une petite protéine membranaire hydrophobe qui a été démontrée comme étant essentielle à l'initiation de l'infection virale (Sakai *et al.* 2003). Une étude récente menée par Griffin *et al.* (2003) suggère que les propriétés de perméabilité membranaire de p7 sont similaires à celles d'un groupe de protéines appelées viroporines. Ainsi, elle serait impliquée dans la formation d'un canal ionique créant un influx d'ions calciques entre le réticulum endoplasmique et le cytoplasme pouvant s'avérer important dans l'assemblage et/ou la relâche des particules virales.

Toutefois, son rôle précis dans le cycle de multiplication du VHC n'a pas encore été clairement défini (Pavlovic *et al.* 2003).

NS2

NS2 est une protéine transmembranaire fortement hydrophobe dont la fonction demeure encore inconnue. Localisée entre la portion C-terminale de NS2 et la portion N-terminale de la protéine NS3, la protéase auto-catalytique NS2/NS3, dont l'activité semble stimulée par les ions zinc (Zn^{2+}), clive la jonction NS2-NS3 lors de la maturation post-traductionnelle de la polyprotéine virale (Hijikata *et al.* 1993).

NS3 et NS4A

NS3 est une protéine multifonctionnelle et hydrophile de 631 acides aminés qui possède un domaine sérine protéase localisé dans son premier tiers N-terminal et un domaine NTPase/hélicase dans ses deux tiers C-terminaux. Servant de co-facteur à l'optimisation de l'activité catalytique de la sérine protéase NS3, la protéine NS4A, polypeptide d'ancrage de 54 acides aminés, permet l'association non covalente du complexe NS3-NS4A aux membranes du réticulum endoplasmique par formation d'une hélice alpha transmembranaire de 20 acides aminés dans son domaine N-terminal hydrophobe (Wolk *et al.* 2000). Sachant que la réplication du VHC est fortement associée aux membranes cellulaires de l'hôte, la formation du complexe sérine protéase NS3-NS4A semble jouer un rôle central dans la réplication et la maturation du VHC.

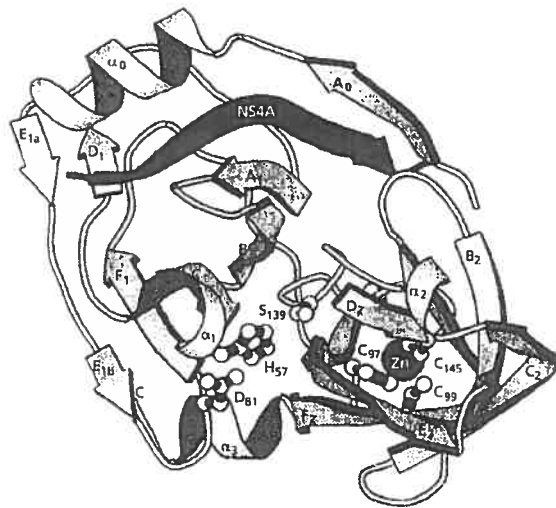


Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la protéase NS3 complexée avec le co-facteur NS4A

(Tirée de : De Francesco *et al.* 1998)

- *Domaine sérine protéase*

La sérine protéase NS3, formant les 181 acides aminés N-terminaux de la protéine NS3, est essentielle dans le clivage protéolytique des jonctions NS3-NS4A, NS4A-NS4B et NS4B-NS5A de la polyprotéine virale mature (Eckart *et al.* 1993). Par association avec le co-facteur NS4A, NS3 adopte une structure canonique repliée de type chymotrypsine, menant à plusieurs changements de conformation, dont le repliement des acides aminés de sa région N-terminale et la relocalisation complète de ses résidus formant la triade catalytique (Ser-139, His-57 et Asp-81). Ainsi, cette réorganisation du domaine N-terminal de la protéase NS3 résulte ultimement en l'alignement adéquat des résidus du site actif de l'enzyme (Figure 15, p. 24). Un second aspect important de la sérine protéase NS3 est la présence d'un tétramère de liaison à l'ion zinc coordonné, via une molécule d'eau, par trois cystéines (Cys-97, Cys-99 et Cys-145) et une histidine (His-149). Ce site de liaison au zinc joue un rôle dans le maintien de la stabilité structurale et guide le repliement du domaine sérine protéase NS3 (Barbato *et al.* 1999; Yan *et al.* 1998).

- *Domaine NTPase/hélicase*

Conférée par son domaine C-terminal de 450 acides aminés, l'activité hélicase de NS3 a pour fonction de séparer les brins positifs et négatifs de l'ARN viral au moment de la réplication, d'abolir les structures secondaires des ARN positifs pour favoriser la traduction des protéines virales et de permettre l'accès de l'ARN polymérase virale aux structure très repliées, telles que l'IRES et la région X de l'extrémité 3' non codante (Kim D. W. *et al.* 1997).

NS4B

NS4B est une petite protéine transmembranaire localisée dans la paroi du réticulum endoplasmique où elle est orientée vers le cytoplasme (Hügler *et al.* 2001). Des expériences de microscopie électronique ont démontré que l'expression de la protéine non structurale NS4B induit la formation d'une toile, dérivée des membranes du RE, qui permet d'englober l'ensemble des protéines structurales et non structurales du VHC. Ainsi, une de ses fonctions serait d'altérer spécifiquement les membranes cellulaires afin de créer une plateforme pour le complexe de réplication (Egger *et al.* 2002).

NS5A

NS5A est une phosphoprotéine dont la structure et la fonction sont inconnues. Elle existe sous deux formes distinctes, de poids moléculaires respectifs 56 et 58 kDa, qui diffèrent par leur degré de phosphorylation. La présence d'une hélice alpha amphipathique dans la portion N-terminale de la protéine NS5A, permettant l'insertion de cette dernière à la surface cytosolique du RE, est impliquée dans des interactions protéines—protéines spécifiques qui seraient essentielles à l'assemblage du complexe de réplication du VHC (Brass *et al.* 2002).

La protéine NS5A a attiré considérablement l'attention de par son rôle potentiel dans la modulation de la réponse au traitement par l'interféron alpha. Les résidus aminés en position 2209-2248 de la polyprotéine du VHC, désignés sous l'appellation ISDR (*interferon sensitivity-determining region*), inhibent la dimérisation de la protéine kinase R (PKR) nécessaire à l'inhibition de la synthèse des protéines chez les eucaryotes. La région d'interaction avec PKR comprend également les acides aminés en aval de la région ISDR, formant ainsi le domaine de fixation à la protéine kinase R (*PKR binding-domain* : résidus 2209-2274) (Gale *et al.* 1997). L'analyse mutationnelle de séquences du gène NS5A d'isolats VHC-1a/1b a permis d'identifier une troisième région hypervariable localisée dans la portion C-terminale de la protéine virale, soit la région V3 (résidus 2356-2379) (Inchauspe *et al.* 1991). La fréquence de mutations dans ce domaine est plus élevée chez les isolats de patients répondeurs au traitement antiviral que chez les non répondeurs, supportant l'hypothèse que la région V3 soit soumise à de fortes pressions de sélection positive résultant en la clairance du virus (Duverlie *et al.* 1998; Layden-Almer *et al.* 2005; Murphy *et al.* 2002; Nousbaum *et al.* 2000; Puig-Basagoiti *et al.* 2005; Sarrazin *et al.* 2002).

NS5B

La protéine NS5B de 66 kDa est localisée à proximité des membranes péri-nucléaires, dans le cœur du complexe de réplication, au cours du cycle de multiplication du VHC. De par son activité polymérasique ARN polymérase ARN dépendante virale, elle a pour fonction d'initier la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire de polarité négative en interagissant avec l'extrémité 3' de la matrice d'ARN de polarité positive (Behrens *et al.* 1996). Toutefois, les mécanismes intimes de la réplication du VHC restent incomplètement

élucidés. Les géotypes, sous-types et isolats du VHC peuvent être distingués par plusieurs méthodes de géotypage; diverses régions génomiques sont ciblées, dont la région 5' non codante (5'NC), la capsid (C) et l'enveloppe E1 (Sandres-Sauné *et al.* 2003), mais le laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) procède à l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne et à l'analyse du gène NS5B par la technique de séquençage direct à partir du plasma de patients infectés (Bottin des services du LSPQ, 2003; Simmonds *et al.* 2005).

Protéine F

Une protéine additionnelle de 17 kDa est exprimée à même la séquence codante de la capsid (xORF) par un glissement ribosomal -2/+1 à proximité du codon 11 (Xu *et al.* 2001). Des études antérieures ont confirmé son expression *in vitro*, en culture cellulaire et *in vivo* (Lo *et al.* 1994; Lo *et al.* 1995). Une étude menée par Xu *et al.* (2003) a démontré que la protéine F est associée au réticulum endoplasmique, de façon similaire aux protéines non structurales et de la capsid, suggérant la possibilité que celle-ci participe à la morphogénèse ou à la réplication du VHC.

Variabilité génétique virale

Le degré élevé d'hétérogénéité génétique du VHC est le résultat de la production accrue de particules virales par les cellules infectées (production—clairance quotidienne : 10^{12} particules virales) ainsi que des propriétés de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN virale. Dépourvue d'une activité 3'—5' exonucléase, la polymérase virale NS5B commet des erreurs lors de la réplication, générant des populations de mutants qui seront soumises à différents niveaux de pressions sélectives, soient les quasi-espèces (Martell *et al.* 1992).

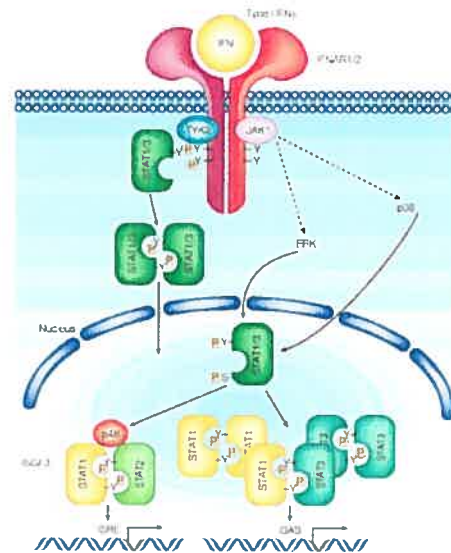
Traitements antiviraux

Chez les patients atteints d'hépatite C chronique, l'objectif principal de la thérapie antivirale est d'induire la clairance du virus afin de diminuer l'inflammation et la nécrose hépatiques susceptibles d'évoluer vers la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire.

L'administration de traitements antiviraux modifie considérablement l'équilibre des cinétiques de réplication virale, ce qui mène à une diminution de l'hétérogénéité des quasi-espèces tout en réduisant le taux de réplication du virus, en l'occurrence la charge virale. Les trois conditions requises et préétablies par les médecins spécialistes afin d'engager la thérapie antivirale sont les suivantes : (1) absence de facteurs de comorbidité; (2) volonté du patient et (3) stade de fibrose supérieur à $3/6$. Ayant considérablement progressée depuis la découverte du VHC en 1989, l'efficacité du traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C demeure toujours insuffisante puisque seulement 55% des patients soumis à la bithérapie associant l'interféron alpha pégylé et la ribavirine présentent une réponse virologique prolongée (Figure 17, p. 31). Ainsi, l'enjeu actuel consiste à découvrir de nouvelles cibles antivirales susceptibles d'enrayer efficacement l'infection (Fried *et al.* 2002; Manns *et al.* 2001).

▲ Mécanisme antiviral de l'interféron type I

Les interférons (IFN) sont des cytokines endogènes sécrétées en réponse à divers stimuli, dont les infections virales (Diaz *et al.* 1996). Dotés d'une activité antivirale, ceux-ci sont regroupés selon 2 types : (a) type I : IFN- α (leucocytes), IFN- β (fibroblastes) et IFN- ω ; (b) type 2 : IFN- γ (cellules NK, T CD4+ et T CD8+). Le bras court du chromosome 9 humain contient 13 gènes codant pour différents sous-types de l'interféron alpha. Ceux-ci sont dotés de nombreuses activités biologiques telles que l'inhibition de la réplication virale, l'inhibition de la multiplication cellulaire, l'induction de l'apoptose et la modulation de la réponse immunitaire. L'IFN- α , β et ω exercent leurs actions par interaction avec un récepteur de surface cellulaire commun formé de 2 sous-unités cartographiées sur



Nature Reviews | Immunology

Figure 16 : Voie de signalisation Jak-STAT induite par l'interféron de type I (Tirée de : Katze *et al.* 2002)

le chromosome 21 humain, IFNAR-1 et IFNAR-2 (Figure 16, p. 28) (Balachandran *et al.* 1998; Novick *et al.* 1994). L'hétérodimérisation des sous-unités du récepteur de surface cellulaire, induite sous l'effet de l'interaction avec l'IFN- α/β , active une cascade de signalisation et de transcription cellulaire via les protéines de la voie Jak-STAT. Les protéines STAT (*signal transducer and activator of transcription*) sont des facteurs de transcription cytoplasmique en latence qui sont phosphorylés par la famille de tyrosines kinases *Janus* (JAK) en réponse à la stimulation par l'IFN. Ainsi, l'activation des protéines kinases Jak-1 et Tyk-2, associées respectivement à IFNAR-1 et IFNAR-2, engendre la phosphorylation subséquente des facteurs de transcription cytoplasmique Stat-1 et Stat-2 (Igarashi *et al.* 1994; Kotenko *et al.* 1995). Les protéines Stat-1 et Stat-2 phosphorylées forment des dimères, ainsi qu'un complexe trimérique ISGF-3 constitué des protéines Stat-1, Stat-2 et p48 (IRF-9), qui sont subséquentement transportés vers le noyau afin d'interagir *in cis* avec les séquences ISRE (*IFN-stimulated response element*) de promoteurs des ISG (*IFN-stimulated gene*) et stimuler la transcription de gènes codant pour des protéines antivirales (Fu *et al.* 1992; Lau *et al.* 2000; Reich *et al.* 1987). Parmi les plus décrites sont la protéine kinase dépendante de l'ARN double brin (PKR), le système 2',5'—oligoadénylate synthétase (OAS) et la RNase L.

- 2',5'—oligoadénylate synthétase (OAS)/RNase L

Induite par une molécule d'ARN double brin viral (ARNdb), la 2',5'—oligoadénylate synthétase catalyse la polymérisation de l'adénosine triphosphate en 2',5'—oligoadénylate qui, par la suite, active une endoribonucléase cellulaire, RNase L. Celle-ci a pour fonction de dégrader l'ARN simple brin cellulaire et viral, ce qui entraîne l'inhibition non spécifique de la réplication virale par inhibition de la synthèse des protéines (Carroll *et al.* 1996; Hovanessian *et al.* 1988; Kerr I.M. et Brown R.E., 1978; Zhou *et al.* 1993).

- Protéine kinase R (PKR)

PKR est une protéine kinase cellulaire dont l'activation est dépendante de l'ARN double brin. Elle a pour rôle de catalyser la phosphorylation de plusieurs substrats protéiques, dont elle-même, la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction (eIF2- α) et le facteur inhibiteur de la transcription I κ B (Kumar *et al.* 1994; Samuel C.E.,

1979). La phosphorylation de eIF2- α engendre l'inhibition non spécifique de la traduction des protéines dans la cellule hôte, bloquant ainsi la complétion du cycle de multiplication du VHC (Gale *et al.* 1998).

Dans une étude menée par Kronenberger *et al.* (2001) sur les niveaux d'expression du CD81 à la surface de cellules mononucléaires du sang périphérique et de lymphocytes, il a été démontré que l'interféron alpha engendre une diminution des niveaux d'ARN messager du récepteur cellulaire CD81 au niveau post-transcriptionnel ou traductionnel, ce qui pourrait réduire l'adsorption du virus et ainsi diminuer l'infection *de novo* de cellules cibles. De surcroît, les patients ayant présenté un déclin rapide de la charge virale du VHC en début de traitement avaient des niveaux d'expression du CD81 plus faibles que ceux n'ayant pas présenté de réponse virologique initiale (Kronenberger *et al.* 2001; Zuckerman *et al.* 2003).

▲ *Ribavirine*

La ribavirine est un analogue synthétique de la guanosine qui fut jadis administré aux enfants pour le traitement d'infections respiratoires sévères engendrées par le virus respiratoire syncytial. Découverte en 1972, elle possède un large spectre d'action antivirale, mais ses mécanismes d'action précis sur le VHC restent inconnus (Sidwell *et al.* 1972; Witkowski *et al.* 1972). Plusieurs hypothèses ont été formulées : d'abord, le métabolite intracellulaire majeur de la ribavirine, sous sa forme triphosphorylée, peut inhiber l'inosine monophosphate déshydrogénase, ce qui cause une diminution du niveau des stocks de nucléotides intracellulaires. De plus, il est en mesure de s'incorporer dans la chaîne d'ARN viral lors de la réplication, ce qui inhibe graduellement l'activité de l'ARN polymérase virale (Gallois-Montbrun *et al.* 2003). L'administration de ribavirine chez les patients infectés par le VHC, combinée à l'IFN- α , a pour but de prévenir une rechute éventuelle suivant l'arrêt de la bithérapie. Ceci suggère également que la ribavirine accélère la clairance de cellules infectées en potentialisant l'effet immunomodulateur de l'IFN- α (Fried *et al.* 2002; Manns *et al.* 2001; McHutchison *et al.* 1998; McHutchison J., 1999; Poynard *et al.* 1998).

Facteurs impliqués dans l'échec thérapeutique

L'échec thérapeutique, associé à l'absence d'éradication de l'infection par le VHC via le traitement par l'IFN- α combiné ou non à la ribavirine, est causée par la combinaison de divers facteurs, dont le régime thérapeutique, les facteurs de l'hôte, la sévérité de la maladie hépatique et les facteurs viraux.

▲ Régime thérapeutique

L'efficacité du traitement antiviral est définie par l'acquisition d'une réponse virologique prolongée, soit l'absence de détection de l'ARN viral six mois après l'arrêt du traitement. La réponse au traitement antiviral est également définie biochimiquement, soit par la normalisation des niveaux d'ALT sériques (McHutchison J., 1999). Les patients présentant un tel profil de réponse ne font que très rarement une rechute à la thérapie antivirale. Dans le cas contraire, les sujets chez lesquels le virus réapparaît suivant une réponse virologique initiale sont classés parmi le groupe de répondeurs partiels. Une proportion de ceux-ci va répondre adéquatement à un traitement subséquent, mais la probabilité de réponse soutenue décroît après chaque rechute. Les patients non répondeurs, soient ceux dont le virus demeure présent suivant les trois premiers mois de traitement, ont une prise en charge qui s'avère beaucoup plus complexe (McHutchison J., 1999).

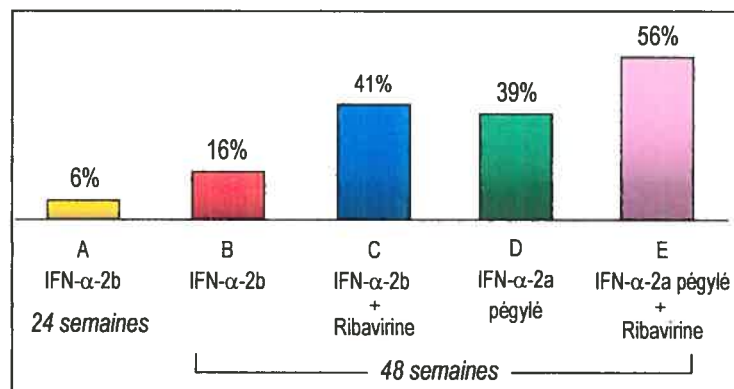


Figure 17 : Évolution de l'efficacité du traitement de l'hépatite C chronique
(Données tirées de : références indiquées dans le texte ci-dessous)

Vers la fin des années 1980, la monothérapie avec l'interféron alpha standard, administrée pendant 24 semaines, permettait d'obtenir moins de 10% de réponse virologique prolongée. Ce taux a toutefois augmenté à 16% lorsque le traitement fut prolongé à 48 semaines (McHutchison *et al.* 1998; Poynard *et al.* 1998). L'utilisation de doses plus élevées d'IFN- α n'a pas permis d'améliorer l'efficacité thérapeutique et occasionnait des effets secondaires indésirables aux patients. L'avènement de la bithérapie en 1998, associant la ribavirine et l'IFN- α , permettait l'obtention d'un taux de réponses prolongées nettement supérieur à celui obtenu avec l'IFN- α seul, soit d'environ 40% (McHutchison *et al.* 1998; Poynard *et al.* 1998; Zeuzem *et al.* 2000). La conjugaison d'une molécule de polyéthylène glycol à l'IFN- α standard (IFN-PEG) a permis d'accroître davantage l'efficacité du traitement. En effet, cette modification chimique diminue l'élimination rénale de l'IFN, augmentant ainsi de façon importante sa demi-vie et diminue l'immunogénicité de la protéine (Fried *et al.* 2002; Manns *et al.* 2001). Étant deux fois plus efficace en monothérapie que l'IFN- α standard, l'IFN- α pégylé, combiné à la ribavirine, a permis d'accroître l'efficacité de la bithérapie à un taux d'environ 55% de réponses prolongées (tous génotypes confondus), ce qui représente la meilleure efficacité obtenue jusqu'à ce jour pour le traitement de l'hépatite C (Figure 17, p. 31) (Fried *et al.* 2002; Manns *et al.* 2001).

▲ *Facteurs de l'hôte*

Plusieurs caractéristiques définissant les patients infectés par le VHC, dont l'âge avancé, le sexe masculin et certains groupes ethniques (africains ou hispaniques versus caucasiens ou asiatiques) ont été associées à un plus faible ratio de réponses virologiques prolongées, possiblement en rapport avec différents déterminants génétiques, hormonaux et/ou immunologiques de la sensibilité du VHC à l'IFN- α (McHutchison *et al.* 1998; McHutchison *et al.* 1999; Poynard *et al.* 1998). L'obésité peut également influencer l'efficacité de la thérapie par l'IFN- α en modifiant le volume de distribution du médicament ainsi que sa concentration finale au niveau des récepteurs cibles (Lam *et al.* 1997; Pawlotsky *et al.* 1996). Plusieurs comportements ont été associés à des niveaux de réponse virologique plus faibles,

dont la consommation accrue d'alcool, l'usage de drogues injectables et de produits du tabac (Schiff E.R., 1999).

Certaines formes de maladies hépatiques liées à l'infection par le VHC, dont la fibrose avancée et la cirrhose compensée, sont associées à de faibles taux de réponse à la thérapie antivirale. Le traitement de l'infection est toutefois contre-indiqué chez les patients avec cirrhose décompensée. Le développement d'une réponse immunitaire de type cellulaire dirigée vers les antigènes du VHC est un déterminant critique dans la résolution de l'infection ainsi que la clairance virale chez les patients en hépatite C aiguë. Ainsi, une réponse immunitaire insuffisante, de type cellulaire (CD4⁺ et CD8⁺) et humorale (anticorps neutralisants), peut résulter en la persistance de l'infection (Gerlach *et al.* 1999).

▲ *Facteurs viraux*

▲ *Charge virale*

Comme mentionné précédemment, le VHC est doté d'une cinétique de réplication très rapide, avec une demi-vie moyenne des particules virales dans la circulation générale estimée à moins de 3 heures (Neumann *et al.* 1998). Plusieurs études ont démontré que la charge virale en prétraitement est un facteur déterminant de la réponse à la monothérapie par l'IFN ou à la bithérapie combinant IFN et ribavirine (McHutchison *et al.* 1998; Shiratori *et al.* 1997). De ce fait, une charge virale pré-thérapeutique faible, soit inférieure à 2×10^5 copies/ml, est associée à une réponse virologique soutenue à la thérapie antivirale (Shiratori *et al.* 1997).

▲ *Génotypes*

La réponse aux thérapies antivirales varie considérablement entre génotypes du VHC. En effet, les génotypes 1a, 1b et 4 sont relativement résistants à la thérapie par l'IFN, comparativement aux génotypes 2 et 3 (Anonyme, 1999; Davis *et al.* 1998; McHutchison *et al.* 1998; Neumann *et al.* 2002; Poynard *et al.* 1998). De surcroît, le sous-type 1b est associé au plus faible taux de réponse à l'IFN et sa prévalence est nettement plus élevée chez

les patients cirrhotiques, suggérant qu'il est impliqué dans l'induction d'une maladie hépatique progressive (Simmonds, P., 1997).

▲ *Quasi-espèces*

Tout comme de nombreux virus à ARN, le VHC circule chez un patient infecté sous la forme d'une quasi-espèce virale, soit un mélange complexe et en équilibre instable de variants viraux génétiquement distincts mais apparentés, ce qui favorise sa survie (Martell *et al.* 1992). L'évolution rapide des virus à ARN, de par la présence d'une polymérase virale infidèle, engendre la sélection rapide et continue de variants les mieux adaptés à l'environnement au sein duquel le virus se réplique (Sandres-Sauné *et al.* 2003).

De surcroît, les quasi-espèces sont constamment sous l'influence de trois ordres de pressions évolutives : (1) accumulation rapide et au hasard de mutations lors de la réplication; (2) pressions négatives exercées sur le génome viral et les protéines afin de conserver les propriétés fonctionnelles assurant la survie des variants; (3) pressions de sélection positives exercées sur le génome et les protéines virales par les réponses immunitaires de type cellulaire ou humorale (anticorps neutralisants) de l'hôte (Neumann *et al.* 1998; Weiner *et al.* 1995). Le degré d'hétérogénéité d'une quasi-espèce est évalué à deux instances différentes : (a) la complexité génétique, définie selon le nombre total de variants viraux identifiés dans un seul prélèvement; (b) la diversité génétique, représentant la distance génétique moyenne entre les différents variants. Conséquemment à un changement de l'environnement de l'hôte parasité, l'équilibre de la quasi-espèce virale peut être soudainement rompu, ce qui entraîne l'évolution rapide des variants viraux et l'émergence d'une population virale en déséquilibre. La capacité d'adaptation des quasi-espèces virales aux modifications de l'environnement joue un rôle important dans la physiopathologie de l'infection, la persistance virale, l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte et la résistance aux traitements antiviraux.

Mécanismes de persistance virale

▲ Sérine protéase NS3

La persistance de l'infection par le VHC est largement dépendante de l'inhibition virale des mécanismes de défense de l'hôte. Les récepteurs Toll-like (TLR) jouent un rôle important dans l'immunité innée en interagissant avec des composantes structurales distinctes d'origine bactérienne ou virale. Les protéines TLR sont formées d'un domaine extracellulaire riche en leucine, d'un domaine C-terminal et d'une queue cytoplasmique appelée TIR. L'induction d'un signal de transduction cellulaire via TLR2, TLR3, TLR4 TLR5, TLR7 et TLR9 nécessite l'interaction du domaine cytoplasmique TIR avec une protéine adaptatrice MyD88, ce qui promouvoit le recrutement et l'autophosphorylation de IRAK et TRAF6 (Alexopoulou *et al.* 2001; Cao *et al.* 1996; Wesche *et al.* 1997). Un second adaptateur du domaine TIR au niveau des TLR4, soit TIRAP/Mal, est impliqué dans l'activation de NF- κ B en réponse aux lipopolysaccharides bactériens (LPS) (Figure 18, p. 35) (Fitzgerald *et al.* 2001; Horng *et al.* 2001).

Lors d'une infection virale, le récepteur Toll-like 3 (TLR3) interagit avec l'ARN double brin viral, ce qui active une cascade de signalisation en aval du récepteur menant à la production d'IFN- β (Alexopoulou *et al.* 2001). Il a été démontré que TLR3 peut activer la voie NF- κ B indépendamment du facteur de différenciation myéloïde 88 (Alexopoulou *et al.* 2001). La synthèse d'IFN- β dépendante de l'interaction TLR3—ARNdb viral semble être principalement induite par une troisième molécule adaptatrice du domaine cytoplasmique TIR dénommée TRIF (Jiang *et al.* 2004; Oshiumi *et al.* 2003; Sato *et al.* 2003). Celle-ci mène à l'activation de la voie NF- κ B, via l'activation d'un complexe canonique IKK $\alpha\beta\gamma$, ainsi qu'à la phosphorylation de IRF3 (Oshiumi *et al.* 2003). Les composantes de la voie de signalisation régulant

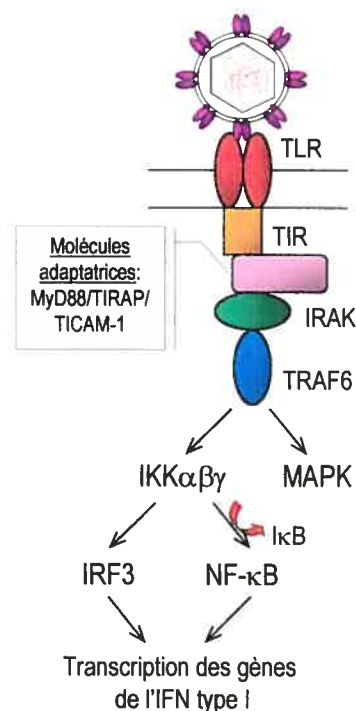


Figure 18 : Voie de signalisation des récepteurs Toll-like

l'activation de NF- κ B et IRF-3 en amont de TLR-3 et TRIF n'ont toutefois pas été identifiées (Imler et Hoffmann, 2003).

IRF-3 est un régulateur transcriptionnel très important dans la réponse immunitaire antivirale. Suivant l'infection virale, IRF-3 est activé par phosphorylation de son domaine C-terminal via les kinases TBK1 et IKK ϵ du complexe VAK (Fitzgerald *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2003). Cette modification biochimique engendre la dimérisation de IRF-3 avec le co-activateur CBP/p300 et la translocation nucléaire simultanée de ceux-ci afin d'activer les promoteurs de l'IFN- β , soient les gènes ISG56, ISG15 et RANTES (Yoneyama *et al.* 1998). Par la suite, les IFN sécrétés se lient à des récepteurs IFN- α/β de façon autocrine ou paracrine, ce qui induit la transcription de plusieurs gènes cellulaires par l'intermédiaire de ISGF3. Parmi ceux-ci, l'IRF-7 est un régulateur important de la synthèse d'IFN- β en réponse à l'infection virale. De surcroît, il constitue un facteur déterminant dans l'induction des gènes de l'IFN- α au sein de cellules infectées, générant une production massive d'IFN type I via un mécanisme de rétroaction positive (Marie *et al.* 1998; Sato *et al.* 2000; Yeow *et al.* 2000).

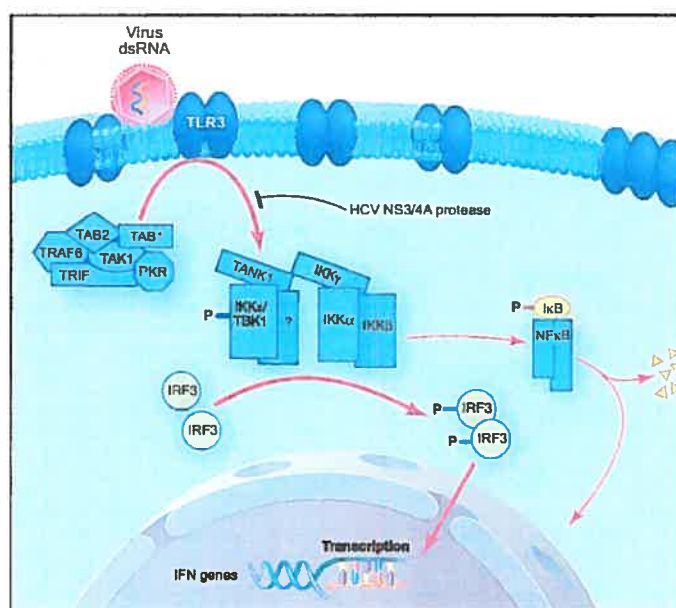


Figure 19 : Induction et inhibition de la synthèse d'interféron
(Tirée de : Williams et Sen, 2003)

Un rapport de Foy *et al.*, publié en mai 2003, présente des éléments tangibles quant à l'existence d'un mécanisme d'inhibition de la phosphorylation de IRF-3 dans les cellules

Huh7 exprimant la sérine protéase NS3/4A du VHC (Figure 19, p. 36). Ils ont démontré que seule l'activité protéase du complexe NS3/4A est requise afin de bloquer l'accumulation de l'isoforme hyperphosphorylé du facteur de régulation 3 de l'interféron ainsi que sa translocation vers le noyau. Jusqu'alors inconnues, deux cibles potentielles de NS3/4A ont été proposées : TRIF et TBK1. De récents travaux ont démontré que le complexe enzymatique NS3/4A induit la protéolyse de la molécule adaptatrice TRIF. Ainsi, l'inhibition de la voie de signalisation cellulaire impliquant IRF-3, ainsi que NF- κ B, pourrait contribuer à la persistance de l'infection par le VHC par absence d'expression des IFN type I et ISG (Ferreon *et al.* 2005; Li *et al.* 2005). En contre partie, Otsuka *et al.* (2005) a identifié une interaction physique entre le domaine hélicase NS3/4A et TBK1, bloquant ainsi l'association entre TBK1 et IRF-3 et, de surcroît, l'activité des promoteurs de l'IFN- β .

En somme, ces mécanismes de résistance employés par le VHC afin de détourner le système immunitaire de l'hôte incitent les équipes de recherche à développer des inhibiteurs potentiels de la protéase NS3/4 afin de bloquer la réplication virale et de restaurer les défenses innées au sein des hépatocytes infectés.

▲ NS5A et E2

Parmi les différentes protéines du VHC, la glycoprotéine d'enveloppe E2 et la phosphoprotéine NS5A ont des propriétés antagonistes de l'effet antiviral de l'interféron alpha. En effet, il a été démontré que ces deux protéines virales inhibent la PKR *in vitro* (Gale *et al.* 1997; Taylor *et al.* 1999).

▲ ISDR

Le rôle potentiel de mutations dans la région NS5A comme facteur prédictif de la réponse à l'IFN a initialement été rapporté par Enomoto *et al.* (1995). Par analyse de séquences provenant d'isolats VHC-1b d'origine Japonaise, résistants et sensibles à l'IFN, une petite région localisée dans la portion C-terminale de NS5A (codons 2209-2248), désignée ISDR, présentait des changements prédominants d'acides aminés associés à la résistance au traitement par l'interféron. Ces travaux ont mené à l'hypothèse que la souche de type sauvage du VHC-1b, exempte de

mutations dans la région NS5A, serait résistante à l'IFN, tandis que la présence de mutations dans cette région du génome viral conférerait la sensibilité du virus à la thérapie antivirale. Dans une étude subséquente menée chez 84 Japonais infectés par le génotype 1b, Enomoto *et al.* (1996) ont démontré une corrélation significative entre le nombre de mutations localisées dans la région ISDR de NS5A et la réponse au traitement par l'IFN. Dans cette première étude, aucune réponse virologique complète ne fut observée chez les patients avec une quasi-espèce dont la région ISDR était identique au prototype 1b (VHC—J). Dans un second groupe de type intermédiaire (1-3 mutations dans la région ISDR), 13% des patients ont présenté une réponse virologique soutenue à l'IFN. Toutefois, l'ensemble des patients regroupés dans une troisième catégorie, soit le type mutant (4 mutations ou plus dans la région ISDR), ont répondu au traitement antiviral par l'IFN. En somme, un nombre croissant de mutations dans la région ISDR, ainsi qu'une faible virémie en prétraitement, semblent des facteurs prédictifs importants de la réponse au traitement par l'IFN chez les patients infectés (Enomoto *et al.* 1995; 1996). Des résultats concordants à ceux publiés par Enomoto et ses collègues ont été par la suite obtenus par des équipes de recherche au Japon et en Espagne (Chamaya *et al.* 1997; Komatsu *et al.* 1997; Puig-Basagoiti *et al.* 2001), tandis qu'aucune association n'a été observée chez les patients infectés par les génotypes 1a et 1b en Europe et aux États-unis (Hofgartner *et al.* 1997; Khorsi *et al.* 1997; Squadrito *et al.* 1997; Zeuzem *et al.* 1997; Odeberg *et al.* 1998; Pawlotsky *et al.* 1998a; Witherell et Beineke, 2001), remettant ainsi en question la pertinence du domaine ISDR comme marqueur diagnostique potentiel de la thérapie à l'interféron.

Sur la base des travaux de Enomoto et collègues, des études moléculaires ont été réalisées afin de déterminer le rôle précis de la protéine NS5A dans la résistance à l'interféron *in vitro*. Gale *et al.* (1997) ont démontré l'habileté du VHC à établir une infection productive en inhibant la dimérisation et autophosphorylation en *trans* de PKR par interaction avec le domaine catalytique de la kinase cellulaire (Patel *et al.* 1995). Les monomères résultants de PKR sont incapables de phosphoryler eIF2- α , permettant au virus de se répliquer librement dans la cellule hôte (Figure 20, p. 39). La protéine NS5A des prototypes 1a et 1b inhibe le processus de dimérisation par

liaison aux résidus aminés 244-296 de PKR via un mécanisme dépendant de la région ISDR comportant 62 acides aminés, en plus des 26 acides aminés adjacents en C-terminal (Domaine de fixation à PKR : 2209-2274 a.a.). Les quasi-espèces virales présentant un domaine de fixation à PKR divergeant du prototype VHC—J (génotype 1b) perdent leurs propriétés régulatrices de la kinase cellulaire, rendant le virus sensible à l'activité antivirale de l'interféron (Gale *et al.* 1998).

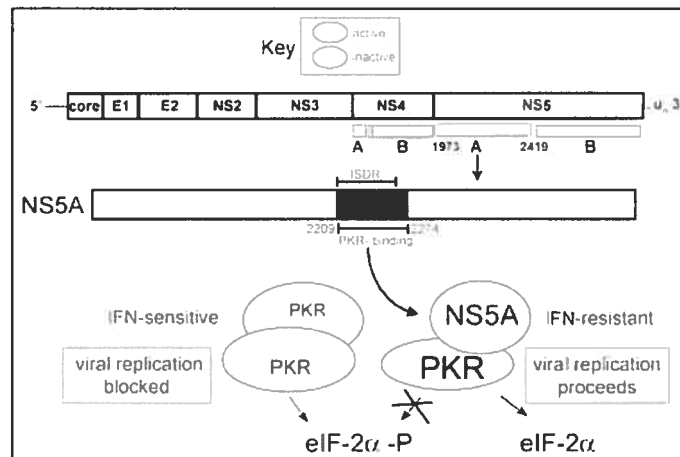


Figure 20 : Rôle de NS5A dans la régulation de PKR durant l'infection par le VHC (Tirée de : Gale *et al.* 1998)

▲ *PePHD*

Taylor *et al.* (1999) ont décrit une séquence de 12 acides aminés dans la portion C-terminale de la protéine E2, appelée PePHD, présentant des analogies au domaine de phosphorylation de PKR et du facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes (eIF2- α), suggérant une interaction entre E2 et PKR. L'inhibition de l'activité kinase et inhibitrice de la synthèse protéique de PKR pourraient résulter en un mécanisme alternatif de résistance des isolats VHC—1 aux propriétés antivirales de l'IFN.

▲ *Quasi-espèces : région hypervariable 1 (HVR1)*

L'infection chronique par le VHC reflète la capacité du virus à établir des stratégies afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Une des composantes clés d'évasion du

VHC est l'infidélité de sa polymérase virale NS5B lors du cycle de réplication. Ainsi, le virus à ARN évolue sous forme d'une quasi-espèce durant l'infection aiguë et la variabilité de régions génomiques ciblées par les effecteurs de l'immunité humorale et cellulaire favorise la persistance de variants faiblement neutralisés. La région hypervariable 1 (HVR1), localisée dans la portion N-terminale du gène E2, est l'une des principales cibles d'anticorps neutralisants et possiblement d'effecteurs cytotoxiques, menant à l'émergence continue de variants viraux aptes à échapper aux mécanismes de défense de l'hôte (Farci *et al.* 1994; Kato *et al.* 1994; van Doorn *et al.* 1995; Weiner *et al.* 1992). Farci *et al.* (2000) ont démontré que la résolution d'une infection aiguë par le VHC est associée à une stase évolutive, tandis que l'hépatite chronique progressive est corrélée à l'évolution génétique des quasi-espèces HVR1. En effet, la plus haute fréquence de changements dans la région HVR1 a été observée chez la majorité des patients infectés par l'hépatite chronique C durant et après le traitement par l'IFN- α , ce qui suggère que le degré de quasi-espèces du VHC est corrélé à la progression de la maladie hépatique (Chambers *et al.* 2005; Farci *et al.* 2002; Gonzalez-Peralta *et al.* 1996; Pawlotsky *et al.* 1998a; Pawlotsky *et al.* 1999). Plusieurs études ont démontré une association entre le degré élevé d'hétérogénéité des quasi-espèces du VHC avant le début du traitement, particulièrement dans la région HVR1 de la glycoprotéine E2, et la faible réponse au traitement par l'IFN (Okada *et al.* 1992; Shindo *et al.* 1996). Suivant cette observation, plusieurs autres travaux ont confirmé qu'un degré élevé de complexité génétique des quasi-espèces du VHC en prétraitement constitue un facteur prédictif indépendant de l'échec thérapeutique (Chen et Wang, 2005; Pawlotsky *et al.* 1998a; Pawlotsky *et al.* 1998b; Sarrazin *et al.* 2001; Toyoda *et al.* 1998). Toutefois, une telle corrélation n'a pas été observée dans les travaux de Lopez-Labrador *et al.* (1999) et Polyak *et al.* (1997). Malgré ces controverses, les données recueillies jusqu'à présent suggèrent que le degré de diversité et de complexité génétique avant l'initiation d'un traitement antiviral pourrait prédire la réponse virologique à l'interféron.

Deux nouveaux rôles complémentaires à celui illustré ci-haut, visant à promouvoir la survie du virus au sein de l'hôte infecté, ont été récemment proposés pour la région hypervariable 1 : (1) amplifier le mécanisme d'entrée cellulaire du virus; (2) protéger les épitopes conservés d'anticorps neutralisants anti-VHC via les récepteurs HDL/SR-BI. La préservation de ces trois fonctions de HVR1 s'avère essentielle à la persistance du VHC

chez l'hôte et est en concordance avec la présence importante d'acides aminés hautement conservés dans ce domaine en N-terminal de la glycoprotéine E2 (Penin *et al.* 2001). Ainsi, la diversification génétique de HVR1 pourrait compromettre l'évasion immunitaire et l'optimisation de l'entrée cellulaire du VHC. Ceci suggère que les propriétés antigéniques de la région hypervariable 1 de E2 sont conférées par les résidus aminés hautement variables (Bartosch *et al.* 2005; Callens *et al.* 2005).

Les travaux récents de Hu *et al.* (2005) ont démontré que le VHC emploie la mimique moléculaire, consistant en l'expression de protéines virales similaires aux structures d'immunomodulateurs et protéines de défense de l'hôte, comme mécanisme de résistance à l'interféron de type I. Sachant que les deux seuls épitopes antigéniques reconnus par des anticorps anti-VHC préexistants sont localisés dans la région HVR1 (Kato *et al.* 1994), Hu et ses collègues (2005) ont obtenu des résultats qui confirment que la région N-terminale de la glycoprotéine E2 est dotée d'une structure et d'une antigénicité similaires aux domaines variables de l'immunoglobuline humaine. La relation directe entre la complexité des quasi-espèces HVR1 et la persistance du VHC est corrélée à l'augmentation de la probabilité de mimique moléculaire reflétée par la diversité structurale élevée de la glycoprotéine E2. De ce fait, la mimique moléculaire pourrait représenter un patron général d'évolution du VHC permettant aux variants viraux d'échapper aux effecteurs de l'immunité de l'hôte (Arenas *et al.* 2004; Hu *et al.* 2005).

Hypothèses et objectifs

D'après les divers travaux publiés dans la littérature jusqu'à présent, les facteurs viraux semblent vraisemblablement impliqués dans la résistance du virus de l'hépatite C au traitement. Ainsi, la présente étude vise à déterminer le rôle de trois régions génomiques du VHC, soient les gènes NS5A, E2 et NS3, dans la réponse virologique à la bithérapie tout en tenant compte des facteurs de l'hôte (âge avancé, sexe masculin, ethnie et stade avancé de la maladie hépatique).

Le virus de l'hépatite C existe sous forme d'une quasi-espèce virale de par sa cinétique de réplication accrue, l'absence d'activité correctrice des erreurs de réplication induites par l'ARN polymérase virale et la présence d'épitopes antigéniques dans la région HVR1 de E2 qui constitue l'une des principales cibles d'anticorps neutralisants. Il existe une corrélation positive entre le degré d'hétérogénéité génétique des quasi-espèces du VHC et la réponse au traitement antiviral (Okada *et al.* 1992; Shindo *et al.* 1996). De plus, une charge virale élevée en prétraitement, ainsi que les génotypes 1 et 4 du VHC, ont été associés à l'échec thérapeutique (Davis *et al.* 1998; Shiratori *et al.* 1997). Par conséquent, nous supposons qu'une charge virale plasmatique élevée, ainsi qu'un degré élevé d'hétérogénéité des quasi-espèces en prétraitement, prédisent un échec thérapeutique. Notre objectif est d'étudier les populations de quasi-espèces HVR1 chez les patients infectés sous traitement.

D'après le modèle de la glycoprotéine E2 proposé par Yagnik *et al.* (2000), les régions HVR2, CD81-1 et CD81-2 sont impliquées dans la liaison du récepteur d'entrée cellulaire CD81. En supposant que la présence de mutations au sein de ces trois régions module l'interaction de la glycoprotéine de surface avec son ligand cellulaire, une corrélation est attendue entre le nombre de mutations dans HVR2, CD81-1 et CD81-2 de la glycoprotéine E2 du VHC et la réponse soutenue à la bithérapie. L'analyse subséquente de ces trois régions du gène E2 sera réalisée chez les patients recrutés au sein de notre étude.

Enomoto et ses collègues (1995 et 1996) ont démontré qu'un nombre élevé de mutations dans la région ISDR d'isolats VHC-1b, ainsi qu'une faible virémie en

prétraitement, semblent des facteurs prédictifs importants de la réponse au traitement par l'IFN. Une troisième région hypervariable (V3), localisée en portion C-terminale du gène NS5A, présente une fréquence de mutations plus élevée chez les isolats de patients répondeurs au traitement antiviral (Duverlie *et al.* 1998). Sachant que la région ISDR des prototypes 1a et 1b du VHC, ainsi que les 26 acides aminés en aval formant le PKR binding-domain, inhibent la dimérisation de PKR induite par l'interféron de type 1 (Gale *et al.* 1997), nous prévoyons un nombre plus élevé de mutations dans les trois régions de NS5A chez les patients ayant une réponse soutenue au traitement antiviral. Nous allons donc analyser les polymorphismes présents dans ces sites de la protéine non structurale NS5A afin de confirmer ou infirmer notre hypothèse.

Jusqu'à présent, il a été suggéré que la protéine d'enveloppe E2, la sérine protéase NS3 et la protéine NS5A du VHC ont un effet antagoniste sur les propriétés antivirales de l'IFN- α (Foy *et al.* 2003; Gale *et al.* 1997; Taylor *et al.* 1999). Puisque la sérine protéase NS3 est indispensable à la réplication et à la survie du VHC, nous supposons que les patients qui présenteront une réponse soutenue à la thérapie antivirale, auront un nombre plus élevé de mutations dans cette région conservée du génome viral que ceux en échec thérapeutique.

L'objectif à long terme de ce projet de recherche est d'identifier de nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse du VHC au traitement et de développer ultérieurement des outils diagnostiques afin d'étudier ces marqueurs. On serait ainsi en mesure d'évaluer d'emblée la réponse attendue à la bithérapie avant de soumettre les patients à un régime thérapeutique qui encoure de nombreux effets secondaires indésirables et qui est très coûteux.

Matériel et méthodes

1. Cohorte et protocole clinique

Vingt-quatre patients infectés chroniquement par le VHC (22 caucasiens, 1 haïtienne et 1 vietnamien) ont été recrutés à Montréal et suivis prospectivement au cours des trois dernières années par le docteur Marc Poliquin de l'hôpital Notre-Dame du CHUM. Le recensement des participants à cette étude, de type cas-témoins nichée sur cohorte prospective, s'est effectué suivant les critères d'inclusion suivants : adultes avec infection chronique au VHC (génotypes 1a ou 1b) sans décompensation hépatique et qui ont accepté de signer le formulaire de consentement. Ainsi, les patients avec cirrhose hépatique décompensée, dont le traitement à l'interféron et/ou à la ribavirine est contre-indiqué ou qui refusent de signer le formulaire de consentement sont automatiquement exclus de ce projet. Selon les recommandations officielles, tous les patients (20 patients infectés par le génotype 1a et 4 patients infectés par le génotype 1b) ont dû préalablement subir une biopsie hépatique afin de déterminer le degré de fibrose et le stade de la maladie hépatique ainsi qu'une prise de sang pour déterminer la présence d'ARN du VHC, le génotype viral, les niveaux d'ALT sériques, etc. Le traitement antiviral recommandé, soit la bithérapie combinant l'interféron α -2b pégylé (1,5 mg/kg/semaine, PEG-Intron®, Schering) et la ribavirine (13-15 mg/kg/jour), a été administré à tous les patients infectés pour une période initiale de douze semaines (Figure 21, p. 45). À ce moment, les sujets sont classés en deux catégories, soient :

- Les répondeurs dit « précoces », qui sont définis par la non détection d'ARN plasmatique du VHC ou diminution de la charge virale d'au moins deux log
- Les non répondeurs, qui sont caractérisés par la détection d'une charge virale plasmatique inchangée ou diminuée de moins de deux log

La bithérapie antivirale est poursuivie jusqu'à un total de 48 semaines dans le cas des répondeurs « précoces », mais le pronostic final des patients de ce groupe est établi après 72 semaines, soit 6 mois suivant la fin du traitement antiviral. Ceux-ci ont alors été distribués en deux groupes, soient :

- Les répondeurs soutenus, caractérisés par l'absence de détection d'ARN viral dans le plasma

- Les répondeurs partiels, présentant une PCR positive après 48 ou 72 semaines suivant l'amorce du protocole clinique

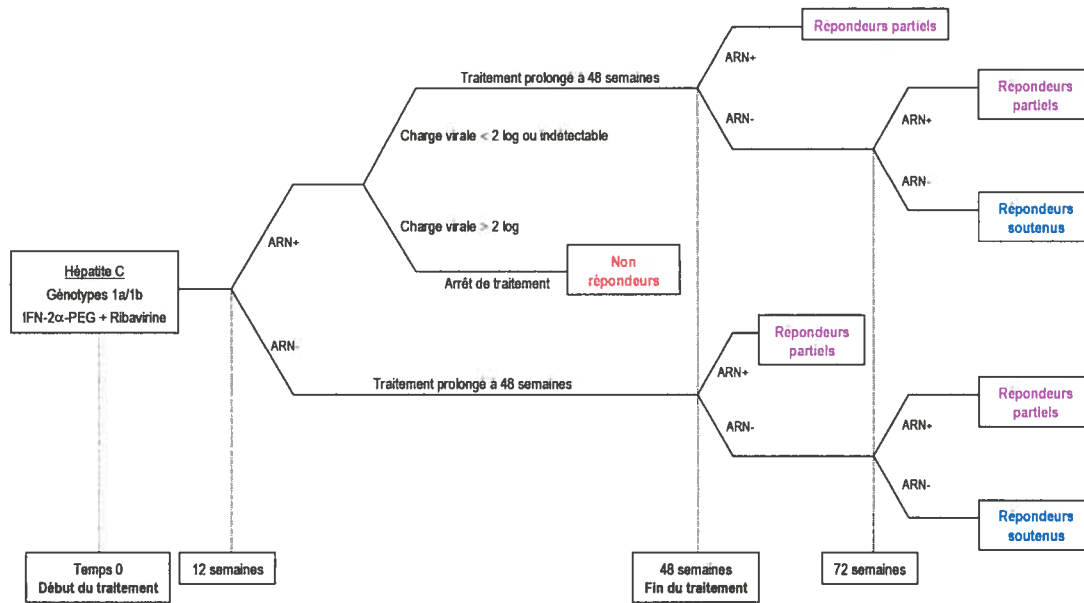


Figure 21 : Représentation schématisée du protocole thérapeutique

2. Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN viral, à partir de 140 μ l de plasma d'un patient infecté par le VHC, a été effectuée à l'aide du QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Canada). L'ARN viral est élué dans 60 μ l de tampon d'élué et chauffé à 65°C pendant 3 minutes avant la mise sur glace (4°C) ou congélation (-20°C).

3. Réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)

3.1 Gènes E2 et NS5A

La transcriptase inverse (RT-PCR), combinée à la première ronde de PCR, fut réalisée dans un thermocycleur 9700 (Applied biosystem, États-unis). Dix microlitres (μ l) d'ARN préalablement extraits ont été ajoutés à un mélange réactionnel de 90 μ l comprenant 320 μ M de chaque dNTP, 50 U de RNase Inhibitor Porcine (Amersham, États-unis), 0,5 mM de chaque amorce (Tableau IV, p. 48), 2,5 mM $MgCl_2$, 9 U de Expand reverse transcriptase (Roche, États-unis), 2,5 U de Taq Expand High Fidelity

PCR system (Roche, États-unis) et 1x de Expand High Fidelity buffer 10x (Roche, États-unis). La RT-PCR fut réalisée en un bloc de 25 minutes à 42°C et 15 minutes à 50°C, suivi de 30 cycles d'amplification, chacun consistant de 90 secondes à 94°C, 90 secondes à 50°C et 5 minutes à 72°C. Dix µl du mélange réactionnel (ADNc) furent par la suite utilisés pour une seconde ronde d'amplification au moyen d'amorces internes (Tableau IV, p. 48); une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C fut poursuivie de 35 cycles d'amplification, chacun consistant de 1 minute à 94°C, 1 minute à 55°C et 1 minute à 72°C, puis une extension finale de 7 minutes à 72°C.

3.2 Région HVR1

Dix µl d'ARN préalablement extraits furent ajoutés à un mélange de 20 µl comprenant 1 mM de chaque dNTP, 10 mM de dithiothreitol (Roche, États-Unis), 20 U de RNase Inhibitor Porcine (Amersham, États-Unis), 0,5 mM de l'amorce E2OA (Tableau V, p. 49), 9 U de Expand reverse transcriptase (Roche, États-Unis) et 1x de Expand High Fidelity buffer 5x (Roche, États-Unis). La RT fut réalisée en un bloc de 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 95°C. Dix µl de produits, obtenus suite à la réaction de transcription inverse, furent mélangés à une mixture de 50 µl comprenant 0,2 mM de chaque dNTP, 2,5 mM de MgSO₄ (Invitrogen, États-Unis), 0,5 mM de l'amorce E2OS (Tableau V, p. 49), 2 U de Platinum® *Taq* DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen, États-Unis) et 1x de High Fidelity PCR buffer 10x (Invitrogen, États-Unis). La réaction d'amplification débuta par une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C, suivie de 40 cycles consistant de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 45 secondes à 72°C, avec une extension finale de 10 minutes à 72°C.

3.3 Gène NS3

Dix µl d'ARN préalablement extraits furent ajoutés à un mélange de 20 µl comprenant 1 mM de chaque dNTP, 10 mM de dithiothreitol (Roche, États-Unis), 20 U de RNase Inhibitor Porcine (Amersham, États-Unis), 0,5 mM de l'amorce P1a1/P1b1 (Tableau VI, p. 49), 9 U de Expand reverse transcriptase (Roche, États-Unis) et 1x de Expand High Fidelity buffer 5x (Roche, États-Unis). La RT fut réalisée en un bloc de 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 95°C. Dix µl de produits obtenus

suite à la réaction de transcription inverse furent mélangés à une mixture de 50 μl comprenant 0,2 mM de chaque dNTP, 2,5 mM de MgSO_4 (Invitrogen, États-Unis), 0,5 mM de l'amorce P1a0/P1b0 (Tableau VI, p. 49), 2 U de Platinum® *Taq* DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen, États-Unis) et 1x de High Fidelity PCR buffer 10x (Invitrogen, États-Unis). La réaction d'amplification débuta par une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C, suivie de 35 cycles consistant de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 45 secondes à 72°C, avec une extension finale de 7 minutes à 72°C. Un μl d'ADNc fut par la suite soumis à une seconde ronde d'amplification, à partir d'amorces internes P1a2/P1a3 ou P1b2/P1b3 (Tableau VI, p. 49), pendant 35 cycles suivant une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C; chacun des cycles consista de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 45 secondes à 72°C, avec une extension finale de 7 minutes à 72°C.

4. *Migration et purification des produits de PCR*

Les produits de PCR ont été soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (Invitrogen, États-unis) avec bromure d'éthidium, à une intensité de 85V pendant 30-45 minutes. La purification des produits de PCR fut réalisée au moyen de plaques de filtration à 96 puits disposés sur un support d'aspiration multiscreen (Millipore, États-Unis). Dans chacun des puits, le volume final de produits de PCR est complété à 100 μl avec du TRIS 10 mM pH 8.0. L'aspiration du contenu de la plaque, disposée sur le montage, est effectuée pendant 10 minutes à pression constante (24 mm Hg), suivi d'un lavage des puits avec 100 μl d'eau sans nucléase. L'ADNc viral purifié est alors mis en suspension dans 50 μl de tampon TRIS 10 mM pH 8.0 par agitation pendant 25 minutes à 900 rpm (plaque agitatrice Titramax 101, Heidolph Instruments, États-Unis).

Le dosage de l'ADNc purifié est effectué par migration sur gel d'agarose 1,5% de 6 μl de produits de PCR purifié mélangés à 2 μl de bleu 6X (30% glycérol et 0.0625% de bromophénol), ainsi que 0,5 μg d'un marqueur de poids moléculaire 100 pb (New England Biolab, États-unis). Ce dernier sert de point de référence dans l'estimation de la quantité d'ADN nécessaire à la réaction de séquence de chacun des échantillons.

Tableau IV : Amorces de la RT-PCR nichée utilisées pour l'amplification des gènes E2 et NSSA du VHC^{a,b}

Domaine et taille	PCR	Amorces	Séquence	Génotype(s)	Position
E2^c 1a, 1b : 380 pb	RT-PCR et 1 ^{re} ronde PCR	E21bcd81-1s	5'-TGCAATGACTCCCTCCACACTGG-3'	1a/1b	1614-1636 pb
		E21bcd81-1a	5'-CCTCCGGGAAAGCAGTCCGTGGGGC-3'	1a/1b	2071-2093 pb
	2 ^e ronde PCR	E21bcd81-2s	5'-CCAGAGCCGATGGCCAGCTG-3'	1a/1b	1686-1705 pb
		E21bcd81-2a	5'-CAAGGTGTTGTTGCCGACCCCCCG-3'	1a/1b	2042-2066 pb
NSSA^d 1a : 1350 pb 1b : 1340 pb	RT-PCR et 1 ^{re} ronde PCR	A1	5'-GTGGATGAACCGGCTGATAG-3'	1a	6083-6102 pb
		A2	5'-ACGTGCTGTAATGGCTGTC-3'	1a	7782-7801 pb
		E1	5'-GAGGGGCTGTGCAGTGGATG-3'	1b	6057-6077 pb
		E2	5'-GCTGCGAGATGTTGTGGCATA-3'	1b	7698-7718 pb
	2 ^e ronde PCR	A3	5'-GGTTCCTGGCTAAGGGACAT-3'	1a	6261-6280 pb
		A4	5'-AAGACATTGAGCAGCACACG-3'	1a	7592-7611 pb
I3		5'-TCCGGCTGTGGCTAAGGGA-3'	1b	6246-6265 pb	
I4		5'-GCAGCAGACGACATCCTCAC-3'	1b	7567-7586 pb	

^a La position des amorces est indiquée en fonction de la souche HCV J (n° d'accession Genbank D90208) et HCV-1 (n° d'accession Genbank M62321). ^b pb : taille d'un fragment d'ADN en paire de base. ^c Hofmann *et al.*, 2003. ^d Duverlie *et al.*, 1998.

Tableau V: Amorces de la RT-PCR utilisées pour l'amplification de la région HVR1 du VHC^{a,b}

Domaine et taille	PCR	Amorces	Séquence	Génotype(s)	Position
HVR1^c	RT	E20A	5'-TCTCAGGACAGCCTGAAGMGTGAA-3'	1a/1b	1680-1704 pb
	PCR	E20S	5'-GCCATATAACGGGGTCACCCGATGGC-3'		1273-1297 pb

^a La position des amorces est indiquée en fonction de la souche HCV J (n° d'accèsion Genbank D90208) et HCV-1 (n° d'accèsion Genbank M62321). ^b pb : taille d'un fragment d'ADN en paire de base. ^c Alfonso et al. 2004

Tableau VI : Amorces de la RT-PCR utilisées pour l'amplification du gène NS3 du VHC^{a,b}

Domaine et taille	PCR	Amorces	Séquence	Génotype(s)	Position
NS3^c	RT	P1a1	5'-ACCTTATAGCCCTGAGCTGC-3'	1a	4074-4093 pb
		P1b1	5'-TTGTACCCTTGGGCTGCATA-3'	1b	4059-4078 pb
	1 ^{re} ronde PCR	P1a0	5'-TCGTCTTCTCCCAAATGGAG-3'	1a	3262-3281 pb
		P1b0	5'-TCGTCTTCTGACATGGAG-3'	1b	3250-3269 pb
	2 ^e ronde PCR	P1a2	5'-CTCATCACCGTGGGGGCGCAGA-3'	1a	3288-3307 pb
		P1a3	5'-TTGGTGTCTTTGGCCGCTGCC-3'	1a	4038-4057 pb
P1b2		5'-TCATCACCGTGGGGGCGCAGA-3'	1b	3277-3296 pb	
		P1b3	5'-GTGCTCTTGGCCGCTGCCAGT-3'	1b	4023-4042 pb

^a La position des amorces est indiquée en fonction de la souche HCV J (n° d'accèsion Genbank D90208) et HCV-1 (n° d'accèsion Genbank M62321). ^b pb : taille d'un fragment d'ADN en paire de base. ^c Lodrini et al. 2003

5. Clonage de la région HVR1

5.1 Ligation

Les fragments HVR1 de 431 pb sont ligués dans un vecteur pCR[®]4-TOPO[®] (TOPO TA cloning[®] kit for sequencing, Invitrogen, États-Unis) sans avoir été préalablement purifiés. La réaction de clonage TOPO[®], dont le volume final totalise 6 μ l, comprend 1 μ l de produit de PCR frais du jour, 1 μ l du vecteur TOPO[®], 1 μ l de solution saline et 3 μ l d'eau stérile (Invitrogen, États-Unis).

5.2 Transformation

Suivant le protocole du fabricant, deux μ l de la réaction de clonage TOPO[®] sont utilisés pour la transformation de cellules *Escherichia coli* TOP10 compétentes chimiquement (One Shot[®] cells, Invitrogen, États-Unis). Chaque culture transformée a été étalée uniformément sur gélose Luria-Bertani contenant 50 μ g/ml de kanamycine (Invitrogen, États-Unis) et incubée à 37°C pendant environ 12 heures.

5.3 Amplification des clones

L'amplification des inserts est effectuée par suspension d'une colonie dans un mélange réactionnel de 50 μ l comprenant 200 μ M de chaque dNTP, 0,4 mM de chacune des amorces M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') et M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 2U de AmpliTaq[®] DNA polymerase (Applied biosystems, États-Unis) et 1x de PCR buffer 10x. La lyse des bactéries, ainsi que l'inactivation des nucléases, surviennent en début de protocole après exposition à 94°C pendant 10 minutes, suivie de 30 cycles consistant de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 56°C et 45 secondes à 72°C, avec une extension finale de 10 minutes à 72°C. Les fragments résultants, de 605 pb, sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, purifiés en plaque et soumis à une réaction de séquence, telle que décrite ci-dessous, avec les amorces M13F et M13R diluées à 3,2 pmol/ μ l. Vingt clones par patient ont été amplifiés et séquencés afin d'analyser les populations de quasi-espèces.

6. Réaction de séquence

Le séquençage bidirectionnel des produits de PCR a été réalisé par utilisation de Big dye terminator cycle sequencing kit version 3.1 (Applied biosystems, États-Unis), suivant les instructions du fabricant. La quantité d'ADN nécessaire à la réaction de séquence doit être comprise entre 1 et 10 ng pour 100 pb. Les amorces internes sens et anti-sens de PCR des gènes E2 (E21bCD81-2s, E21bCD81-2a), NS5A (A3, A4, I3, I4) et NS3 (P1a2, P1a3, P1b2, P1b3), diluées à 3,2 pmol/ μ l, ont servi d'amorces de séquençage (Tableaux IV et VI, p. 48-49). De par la grande taille du fragment de NS5A, des amorces internes additionnelles ont été utilisées afin d'obtenir les séquences nucléotidiques complètes des deux brins (Tableau VII, p. 51).

Tableau VII : Amorces internes utilisées dans la réaction de séquence du gène NS5A

Amorce ^a	Séquence	Génotypes
S227	5'-CCCATCAACGCRTACACC-3'	1a/1b
S534	5'-ATTCCAGGTCGGGCTCAACCA-3'	1a/1b
S775	5'-ATCGAGGCCAACCTCCTGTGG-3'	1a/1b
S1033	5'-GGGTGCCCDYTGCCRCCT-3'	1a/1b
AS306	5'-GCAGGGGCCCGTGGTGTA-3'	1a/1b
AS504	5'-CGCCGGAGCGTACCTGTG-3'	1a/1b
AS818	5'-TGTTCCCGCCATCTCCT-3'	1a/1b
AS1174	5'-CGGCHGAYGACYCRGAGC-3'	1a/1b

^a Duverlie *et al.* 1998

7. Précipitation des produits de PCR

Le protocole de précipitation a été effectué en plaques avec éthanol/sodium acétate/EDTA, suivant les directives du fabricant en ce qui a trait à la version 3.1 du Big dye terminator cycle sequencing kit (Applied biosystems, États-Unis). D'abord, il s'agit d'ajouter 4 μ l d'un mélange 1 :1 de EDTA 125 mM pH 8.0 et NaAC 3 M pH 5.2 ainsi que 50 μ l d'éthanol 100% dans chacun des puits; bien mélanger avec la pipette multicanaux et incubé 15 minutes à température pièce. Ensuite, il faut centrifuger la plaque pendant 45 minutes à 4°C, à une vitesse de 3650 rpm, puis en vider le contenu en centrifugeant 1

minute à 500 rpm en position inversée. Par la suite, il s'agit d'ajouter 130 μ l d'éthanol 70% à chacun des puits et centrifuger la plaque pendant 15 minutes, à 4°C, à une vitesse de 3650 rpm. Le contenu de la plaque est alors vidé par centrifugation en position inversée, puis les culots d'ADNc sont resuspendus dans 15 μ l de formamide Hi-Di (Applied biosystems, États-Unis).

8. Séquençage

L'analyse des séquences d'ADN a été effectuée au moyen d'un séquenceur automatique à 16 capillaires, soit le modèle 3100 genetic analyser (Applied biosystems, États-Unis).

9. Analyse génétique et statistique

9.1 Analyse des paramètres génétiques

Les séquences ont été alignées par CLUSTAL W. L'analyse des bases dégénérées (code IUPAC), ainsi que la formation de contig, ont été réalisées par des programmes dérivés du logiciel Lasergene, DNASTAR Inc. (version 5.07, États-unis, 2003). Le calcul des distances moléculaires fut réalisé par le programme MEGA (version 3.0; département de biologie de l'université d'Arizona [<http://www.megasoftware.net>]) : (1) la distance génétique moyenne (d) a été calculée par la méthode de Kimura deux paramètres; (2) le nombre de substitutions synonymes par site synonyme (dS) et le nombre de substitutions non synonymes par site non synonyme (dN) ont été calculés par la méthode de Nei-Gojobori avec la correction Jukes-Cantor; (3) le nombre de substitutions d'acides aminés (dAA) a été calculé par la méthode de correction de Poisson (Kumar *et al.* 2004).

La complexité génétique des clones est évaluée par l'entropie de Shannon (S_n), qui se définit selon les différentes séquences ou groupe de séquences qui apparaissent différents à un endroit précis; celle-ci est calculée à des niveaux de nucléotide ou acide aminée comme suit : $S = - \sum_i (p_i \ln p_i)$, où p_i correspond à la fréquence de chaque séquence dans la population de quasi-espèces virales. L'entropie de Shannon est normalisée selon $S_n = S/\ln N$, où N est le nombre total de séquences analysées pour chaque patient (Pawlotsky *et al.* 1998b).

9.2 Analyse de mutations

L'ensemble des mutations au sein de la glycoprotéine E2 (régions : HVR2, CD81-1, CD81-2), de la protéine NS5A (régions : ISDR, PKR binding-domain, V3) et de la sérine protéase NS3 a été évalué en faisant la médiane plus ou moins le 25^e et 75^e percentile du nombre total de substitutions globales, non synonymes et non conservées pour chaque domaine respectif du VHC par comparaison avec les séquences consensus du VHC-1a (no d'accession M62321) et VHC-1b (no d'accession D90208), et ce, de façon distincte pour les trois groupes de patients à l'étude. Afin d'évaluer l'importance des substitutions d'acides aminés identifiées, l'analyse subséquente de celles-ci fut réalisée en fonction de leurs propriétés fonctionnelles. La commutation d'acides aminés par d'autres, ayant des propriétés biologiques similaires, pourrait ne pas engendrer d'altérations de la fonction ou de la conformation des protéines E2, NS5A et NS3 résultantes; par conséquent, ces substitutions non synonymes sont dites conservées. Le calcul des changements conservés et non conservés d'acides aminés a été effectué suivant 6 groupes d'acides aminés différents avec des propriétés similaires (Nakashima *et al.* 1986; Mirny et Shakhnovich, 1999) : positif (Arg, Lys), négatif (Asp, Glu), aromatique (His, Phe, Trp, Tyr), polaire (Asn, Gln, Ser, Thr), aliphatique (Ala, Ile, Leu, Met, Val, Cys) et acides aminés avec propriétés spéciales (Gly, Pro).

9.3 Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été faites au moyen du logiciel SPSS Base 10.0 (SPSS, Inc., Chicago). Le test chi-carré de Pearson (χ^2) fut utilisé pour comparer les différences entre les données catégorielles qualitatives (sexe, stade, grade, statut clinique et génotype du VHC) des répondeurs soutenus, partiels et non répondeurs. L'analyse des variables continues quantitatives a été réalisée par le test *t* de Student subséquent à l'évaluation de la distribution normale et de l'homogénéité de variance de celles-ci via les tests paramétriques suivants : test de Kolmogorov-Smirnov à une variable et le test de Levene. En ce qui a trait aux variables continues n'ayant pas suivi une distribution normale, celles-ci furent analysées par le test de Mann-Whitney (test non paramétrique).

Résultats

Taux de réponse à la thérapie antivirale

Un total de 33 patients ont été recrutés et soumis au protocole thérapeutique, mais seulement 24 d'entre eux ont été retenus pour les fins de l'étude (tableau VIII, p. 56). En bref, l'écart d'âge entre les patients (17 hommes et 7 femmes) varie entre 27 et 65 ans. Vingt deux patients sont Caucasiens et 2 patients sont d'origine vietnamienne et haïtienne, respectivement. Vingt patients sont infectés par le génotype 1a du VHC, tandis que 4 patients sont infectés par le génotype 1b du VHC. Onze patients sont naïfs au traitement antiviral, tandis que 13 patients ont déjà été préalablement traités à l'interféron. La combinaison de l'interféron α -2b pégylé et de la ribavirine fut administrée sur une période de 12 semaines chez les 10 non répondeurs (NR : 41,7%), caractérisés par une charge virale inchangée ou diminuée de moins de 2 log après 3 mois de traitement, tandis qu'elle fut prolongée jusqu'à une durée totale de 48 semaines pour les 14 répondeurs précoces (58,3%), dont le pronostic fut défini par une charge virale indétectable ou inférieure à plus de 2 log de celle mesurée avant traitement. Soixante-douze semaines suivant l'initiation de la bithérapie antivirale, seulement la moitié des répondeurs précoces ont atteint une réponse virologique soutenue (SVR : 29,2%) par absence d'ARN viral détectable, alors que 7 patients ont préservé une charge virale positive, reflétant l'absence d'éradication du virus, ou ont fait une rechute suivant l'arrêt du traitement antiviral (ETR : 29,2%).

Rôle des facteurs viraux et de l'hôte sur la réponse au traitement

La comparaison des diverses caractéristiques cliniques chez les 24 patients à l'étude démontre que le statut thérapeutique est un facteur prédictif de la réponse au traitement. En effet, la majorité des patients, ayant été traités préalablement par l'interféron, ne sont pas en mesure d'atteindre une réponse virologique soutenue suivant l'administration d'une bithérapie combinant l'IFN α -2b pégylé à la ribavirine (P groupe 2 = 0,032), tandis que 7 des 11 patients naïfs à la thérapie antivirale ont éradiqué complètement l'infection (P groupe 1 = 0,001). Il a été rapporté dans la littérature que le genre peut influencer la réponse au traitement antiviral (Fried *et al.* 2002; Manns *et al.* 2001; McHutchison *et al.* 1998). On

compte plus de femmes que d'hommes (ratio 4 :3) chez les répondeurs soutenus par comparaison aux répondeurs partiels et non répondeurs confondus (P groupe 1 = 0,053). Une corrélation a été perçue entre l'âge moyen chez les SVR + ETR par rapport aux NR, variant de 44,4 à 51,7 ans, et la réponse virologique soutenue à la bithérapie (P groupe 2 = 0,059). L'association d'un faible degré de nécrose péri-portale et d'inflammation portale à un meilleur taux de réponse à l'IFN (Tsubota *et al.* 1997) semble s'illustrer dans cette cohorte, mais de façon non significative, par comparaison du grade histologique entre les répondeurs soutenus et répondeurs partiels combinés et les non répondeurs (P groupe 2 = 0,058). De ce fait, les résultats obtenus pour l'âge, le sexe et le grade histologique se situent à la limite du seuil de signification, illustrant une tendance à l'association de ces critères cliniques aux facteurs prédictifs de la réponse au traitement. Aucune relation n'a été démontrée entre la réponse au traitement et la race, le stade histologique, le niveau d'ALT sérique, la charge virale et le génotype du VHC (1a et 1b), respectivement ($P > 0,05$).

Tableau VIII : Caractéristiques cliniques et démographiques des patients infectés par le VHC 1a/1b en relation avec la réponse au traitement

Groupes ^{a,b} et P value ^c	No. de patients	Caractéristiques démographiques et cliniques										
		Sexe (M/F)	Âge (année)	Race ^d	Histologie du foie Grade	Stade	Statute	ALT sérique (IU/l) ^f T0	T12	Charge virale (log)	Génotype (1a/1b)	
SVR	4	F	27	C	2/18	0/6	N	69	25	5,25	1a	
	7	F	41	C	5/18	3/6	N	39	25	5,61	1a	
	8	M	60	C	7/18	2/6	N	175	66	6,90	1a	
	10	M	36	C	1/18	0/6	N	236	22	6,37	1a	
	11	F	41	C	5/18	1/6	N	31	19	6,30	1a	
	13	F	48	C	8/18	3/6	N	40	24	6,31	1a	
	20	M	43	C	1/18	1/4	N	161	59	5,59	1a	
	ETR	3	M	45	C	ND	ND	Rtx	103	24	6,58	1a
		15	M	43	C	ND	ND	N	168	83	6,57	1a
		19	M	48	C	8/18	5/6	N	201	30	6,33	1a
29		M	51	C	ND	ND	Rtx	160	116	5,73	1b	
31		M	33	C	3/18	2/6	Rtx	62	22	6,45	1a	
26		M	52	V	3/18	0/6	Rtx	46	22	6,90	1b	
32		M	53	C	ND	ND	Rtx	21	16	6,83	1a	
NR		1	F	46	C	2/4	2/4	Rtx	52	37	6,35	1a
		2	M	57	C	9/18	1/4	Rtx	92	70	6,44	1a
		5	M	48	C	6/18	3/4	Rtx	72	65	6,47	1a
	9	F	62	H	2/4	ND	Rtx	104	69	6,69	1a	
	22	M	54	C	7/18	6/6	N	98	93	6,26	1a	
	28	M	46	C	ND	ND	Rtx	28	30	6,52	1b	
	14	M	33	C	3/4	ND	Rtx	66	57	5,94	1a	
	17	M	50	C	9/18	5/6	N	161	94	6,59	1a	
	18	M	65	I	5/18	2/6	Rtx	82	36	6,67	1b	
	30	F	56	C	ND	ND	Rtx	42	36	5,74	1a	
P groupe 1		0,053*	0,090**	> 0,05*	0,147*	0,323*	0,001*	0,654**	0,151**	0,154**	0,160*	
P groupe 2		0,939*	0,059**	> 0,05*	0,058*	0,110*	0,032*	0,229**	0,107**	0,592**	0,711*	

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c *, déterminé par le test chi-carré de Pearson; **, déterminé par le test t de student. ^d C, caucasien; H, haïtien; I, italien; V, vietnamien. ^e N, naïf; Rtx, retraitement. ^f T0 (temps 0), avant le début du traitement; T12 (temps 12), 3 mois suivant l'initiation du traitement.

Analyse des paramètres génétiques du VHC

Afin d'évaluer les variations génétiques présentes dans la cohorte de patients, la complexité et la diversité génétique furent analysées dans les différentes régions de E2 et NS5A. Un sommaire des paramètres génétiques est présenté dans les tableaux IX à XI (p. 59-61). La complexité génétique en prétraitement a été comparée à deux instances, soient en fonction des séquences en nucléotides et en acides aminés pour la région HVR1. Pour le 1^{er} groupe d'analyse, les valeurs moyennes de la complexité en nucléotides et en acides aminés chez les SVR sont de $0,542 \pm 0,216$ et $0,424 \pm 0,206$, respectivement. En comparaison, les valeurs moyennes pour les ETR + NR sont de $0,649 \pm 0,165$ et $0,480 \pm 0,213$, respectivement. Malgré le fait que les répondeurs partiels et non répondeurs affichent une complexité génétique plus élevée en nucléotides et en acides aminés que les répondeurs soutenus, aucune différence significative n'a été répertoriée ($P_{nt} = 0,221$; $P_{a.a.} = 0,575$). Dans le 2^e groupe d'analyse, les valeurs moyennes de la complexité en nucléotides et en acides aminés chez les SVR + ETR sont de $0,569 \pm 0,197$ et $0,433 \pm 0,214$, respectivement. En comparaison, les valeurs moyennes pour les NR sont de $0,687 \pm 0,149$ et $0,506 \pm 0,203$, respectivement. L'écart entre la complexité génétique des SVR + ETR versus NR (groupe 2) est légèrement plus grand que celui calculé entre les SVR et ETR + NR (groupe 1), illustrant une complexité génétique plus élevée chez les patients ne répondant pas au traitement, mais la différence est non significative ($P_{nt} = 0,140$; $P_{a.a.} = 0,424$). La diversité génétique a été évaluée séparément pour la région HVR1, les domaines HVR2, CD81-1 et CD81-2 de la glycoprotéine E2 et les régions ISDR, PKR binding-domain et V3 de la protéine NS5A, en fonction des séquences de référence du VHC (tableaux IX, p. 59). Les patients non répondeurs du groupe 2 présentent des valeurs légèrement inférieures à celles obtenues chez les répondeurs soutenus du groupe 1 en ce qui a trait à la distance génétique moyenne ($0,118 \pm 0,068$ versus $0,122 \pm 0,089$), les substitutions silencieuses ($0,098 \pm 0,039$ versus $0,103 \pm 0,070$) et les substitutions non silencieuses ($0,125 \pm 0,083$ versus $0,129 \pm 0,100$) de la région HVR1. Par contre, la situation s'inverse pour ce qui est des substitutions d'acides aminés entre NR et SVR ($0,231 \pm 0,151$ versus $0,225 \pm 0,183$). Une diminution de la diversité génétique moyenne dans la région HVR1 est observée simultanément chez les SVR et NR lorsque les paramètres génétiques de ces derniers sont jumelés à ceux des répondeurs partiels, et ce, pour les 4 paramètres à l'étude. L'ensemble

des résultats obtenus n'ont toutefois pas été concluants quant à l'association entre le degré élevé de diversité génétique dans la région HVR1 du VHC et l'échec thérapeutique ($P > 0,05$). Dans les autres domaines analysés de la glycoprotéine E2 (tableaux X, p. 60), la région HVR2 est celle qui présente une plus grande diversité génétique quant à la distance génétique moyenne, les substitutions non silencieuses et les substitutions d'acides aminés, et ce, dans les 2 types d'analyse effectués. Par contre, la région CD81-2 présente le plus grand nombre de mutations synonymes par site synonyme par rapport aux deux autres régions de la glycoprotéine E2. Pareillement à la région HVR1, les répondeurs soutenus (groupe 1) ont une diversité génétique supérieure à celle des non répondeurs (groupe 2) dans la région hypervariable 2, ainsi qu'au niveau des deux domaines de liaison au récepteur CD81, mais la différence n'est pas significative. La région V3 de la protéine NS5A est celle qui semble la plus hétérogène par rapport à la séquence génomique de type sauvage du VHC (tableaux XI, p. 61). Les patients en absence de réponse thérapeutique présentent une diversité génétique supérieure à celle des répondeurs soutenus au niveau de 3 des 4 paramètres génétiques mesurés (d , dS et dN). Le phénomène s'inverse pour les régions ISDR et *PKR binding-domain*, où les SVR ont un degré de diversité légèrement plus marqué que les NR, excepté pour le nombre de substitutions synonymes présentes dans le domaine de liaison à PKR. Aucune corrélation positive n'a pu être établie entre la diversité génétique dans les régions de la glycoprotéine E2 et la protéine NS5A et la réponse au traitement antiviral ($P > 0,05$).

A) Glycoprotéine E2

Tableau IX : Comparaison des paramètres génétiques de la région HVRI du VHC entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^{a,b} ou P value ^c	Nlb. de patients	Paramètres génétiques (écart-type)					
		Complexité génétique		Diversité génétique ^d			
		Nucléotide	Acide aminé	d	dS	DN	dAA
1 (SVR) (ETR + NR)	7 17	0,542 (0,216)	0,424 (0,206)	0,122 (0,089)	0,103 (0,070)	0,129 (0,100)	0,225 (0,183)
P		0,649 (0,165)	0,480 (0,213)	0,099 (0,062)	0,080 (0,040)	0,105 (0,075)	0,198 (0,136)
		0,221*	0,575*	0,502*	0,486*	0,543*	0,706*
2 (SVR + ETR) (NR)	14 10	0,569 (0,197)	0,433 (0,214)	0,096 (0,073)	0,079 (0,058)	0,103 (0,083)	0,188 (0,150)
P		0,687 (0,149)	0,506 (0,203)	0,118 (0,068)	0,098 (0,039)	0,125 (0,083)	0,231 (0,151)
		0,140*	0,424*	0,490*	0,419*	0,545*	0,512*

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR ; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c * déterminé par le test t de student. ^d d, distance génétique ; dS, substitutions silencieuses ; dN, substitutions non silencieuses ; dAA, substitutions d'acides aminés.

Tableau X : Comparaison des paramètres génétiques de la région E2 excluant HVR1 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^a ou P value ^c	Nb. de patients	Diversité génétique (écart-type) ^d											
		HVR2			CD81-1			CD81-2					
		d	ds	dn	dAA	d	ds	dn	dAA	d	ds	dn	dAA
1 (SVR)	7	0,397	0,606	0,321	0,595	0,255	0,785	0,153	0,263	0,188	1,019	0,074	0,167
		(0,284)	(0,277)	(0,267)	(0,438)	(0,155)	(0,425)	(0,127)	(0,188)	(0,081)	(0,788)	(0,020)	(0,054)
(ETR + NR)	17	0,358	0,443	0,315	0,570	0,194	0,502	0,130	0,222	0,168	0,762	0,065	0,146
		(0,274)	(0,317)	(0,259)	(0,405)	(0,140)	(0,486)	(0,104)	(0,150)	(0,079)	(0,606)	(0,035)	(0,084)
P		0,768*	0,272*	0,974**	0,974**	0,385*	0,217*	0,922**	0,602*	0,587*	0,579**	0,459*	0,576*
2 (SVR + ETR)	14	0,402	0,549	0,339	0,617	0,230	0,621	0,147	0,252	0,170	0,852	0,068	0,150
		(0,285)	(0,321)	(0,269)	(0,429)	(0,151)	(0,465)	(0,118)	(0,172)	(0,079)	(0,710)	(0,027)	(0,064)
(NR)	10	0,329	0,420	0,289	0,526	0,191	0,545	0,123	0,212	0,179	0,824	0,068	0,155
		(0,263)	(0,291)	(0,248)	(0,391)	(0,140)	(0,510)	(0,102)	(0,148)	(0,080)	(0,632)	(0,037)	(0,091)
P		0,554*	0,353*	0,784**	0,832**	0,547*	0,723*	0,832**	0,580*	0,810*	0,784**	0,968*	0,873*

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR ; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c , déterminé par le test t de student ; ** , déterminé par Mann-Whitney rank-sum test. ^d d, distance génétique ; ds, substitutions silencieuses ; dn, substitutions non silencieuses ; dAA, substitutions d'acides aminés.

Note: La région E2 excluant HVR1 n'a pu être amplifiée chez le patient 31 (ETR).

B) Protéine NSSA

Tableau XI : Comparaison des paramètres génétiques de la région NSSA entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^{a,b} ou P value ^c	Nb. de patients	Diversité génétique (écart-type) ^d											
		ISDR			PKR binding-domain			V3					
		d	ds	dn	dAA	d	ds	dn	dAA	d	ds	dn	dAA
1 (SVR)	7	0,088 (0,028)	0,362 (0,111)	0,022 (0,016)	0,044 (0,023)	0,078 (0,027)	0,296 (0,088)	0,021 (0,015)	0,045 (0,025)	0,143 (0,056)	0,334 (0,154)	0,076 (0,044)	0,160 (0,108)
(ETR + NR)	17	0,076 (0,021)	0,340 (0,085)	0,012 (0,012)	0,026 (0,023)	0,077 (0,026)	0,310 (0,088)	0,018 (0,014)	0,040 (0,030)	0,163 (0,058)	0,403 (0,150)	0,084 (0,050)	0,152 (0,097)
P		0,307*	0,632*	0,131*	0,119*	0,956*	0,757*	0,661*	0,708*	0,468*	0,344*	0,746*	0,859*
2 (SVR + ETR)	14	0,079 (0,026)	0,342 (0,100)	0,016 (0,014)	0,033 (0,023)	0,077 (0,024)	0,307 (0,083)	0,018 (0,014)	0,040 (0,026)	0,149 (0,060)	0,346 (0,152)	0,082 (0,048)	0,175 (0,110)
(NR)	10	0,081 (0,021)	0,353 (0,086)	0,015 (0,013)	0,031 (0,025)	0,078 (0,028)	0,304 (0,094)	0,020 (0,015)	0,043 (0,031)	0,166 (0,054)	0,430 (0,144)	0,081 (0,049)	0,127 (0,078)
P		0,858*	0,801*	0,887*	0,850*	0,893*	0,934*	0,813*	0,777*	0,522*	0,214*	0,951*	0,275*

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c *, déterminé par le test t de student. ^d d, distance génétique ; ds, substitutions silencieuses ; dn, substitutions non silencieuses ; dAA, substitutions d'acides aminés.

Note: La région NSSA n'a pu être amplifiée chez le patient 32 (ETR).

Analyse des séquences en acides aminés et du nombre de mutations dans les régions E2, NS5A et V3

▪ ***Glycoprotéine E2***

La comparaison de trois régions au sein de la glycoprotéine E2, chez les 24 isolats infectés par le VHC-1, a démontré que la majorité des mutations globales en nucléotides et en acides aminés sont localisées dans la portion C-terminale de E2, soit dans la région CD81-2 (figure 22b, p. 74). Plusieurs acides aminés demeurent très conservés entre les SVR, ETR et NR, suggérant une implication possible de cette région dans la stabilité et l'interaction de la glycoprotéine de surface avec un ligand cellulaire. En effet, 21 des 31 acides aminés formant la région CD81-2 sont demeurés très conservés (codons 538-551). Parmi tous les patients infectés par le sous-type 1a du VHC, la majorité des substitutions d'acides aminés surviennent aux codons 522, 524, 528, 531, 533, 537, 538 et 546. Les acides aminés aux positions 524 (A→V), 528 (S→N/T) et 538 (V→I/L) ont été substitués par des résidus aminés dotés des mêmes propriétés biologiques, tandis que les mutations décelées aux autres positions répertoriées ci haut sont non conservées. Parmi les 12 patients présentant une substitution non synonyme en position 533, 3 NR sur 5 ont un acide aminé ayant des propriétés biologiques différentes par rapport à 1 seul SVR sur 7 SVR + ETR regroupés. Seule la mutation S540N a été répertoriée chez tous les patients infectés par le sous-type 1b du VHC.

La région HVR2, localisée dans la portion N-terminale de la glycoprotéine E2, est très variable au niveau des isolats VHC-1a et VHC-1b (figure 22a, p. 74). Au sein de la région CD81-1, un patron de mutation a été décelé parmi 3 SVR, 1 ETR et 2 NR. Ce motif, constitué de 8 acides aminés, est localisé en parti dans la région HVR2 (VKPDSL₄₇₅₋₄₈₀ a.a.), alors que deux résidus aminés sont situés à l'extrémité C-terminal de la région CD81-1 (P490A; K492Q). La glutamine en position 482 est remplacée par l'histidine ou l'acide glutamique chez 6 des 8 non répondeurs infectés par le VHC-1a par rapport à 4 des 11 patients SVR et ETR combinés. Toutefois, aucun des 4 patients infectés par le sous-type 1b du VHC ne présente de substitution à cette position. Parmi ces derniers, on observe que les trois premiers acides aminés de la région HVR2 sont substitués par les mêmes résidus, soient H474Y, D475A/T et M476E. Les acides aminés en position 483 à 489, arborant le motif

WHY, ainsi que les 2 derniers résidus aminés du domaine CD81-1 (codons 493 et 494), sont demeurés très conservés au sein des isolats analysés en prétraitement.

L'analyse du nombre de mutations à l'intérieur des régions séquencées de la glycoprotéine E2, en comparaison avec la réponse au traitement pour les 2 sous-types du VHC-1, est présentée dans les tableaux XII-XIV (p. 67-69). Au niveau des sites de liaison du récepteur CD81 proposés par Flint *et al.* (1999), ainsi que ceux proposés dans le modèle théorique structural de E2 par Yagnik *et al.* (2000), aucune corrélation significative entre le nombre de mutations et la survenue d'une réponse au traitement n'a été observée chez les isolats VHC-1a et VHC-1b, respectivement. La médiane du nombre total de mutations observée en nucléotides et en acides aminés est quasi la même entre les SVR et NR. La présence de substitutions d'acides aminés non conservées comme facteur biologique pouvant influencer sur les propriétés fonctionnelles et sur la conformation de la glycoprotéine de surface E2 n'a démontré aucune corrélation significative avec la réponse au traitement et ce, pour les 3 régions investiguées.

- **Protéine non structurale 5A (NS5A)**

L'analyse des séquences entières de la protéine NS5A chez les 24 patients infectés chroniquement par le VHC-1 a été réalisée. Après avoir défini plusieurs zones d'étude dans la protéine, la région hypervariable 3 (V3), localisée dans la portion carboxy-terminale de NS5A, se révéla hautement variable. Cette région est notable pour son absence d'homologie entre les génotypes 1a et 1b (Inchauspe *et al.* 1991). En effet, la majorité des substitutions non conservées sont localisées aux positions 2364, 2367, 2372-2377 pour les isolats VHC-1a, tandis que les résidus aminés les plus fréquemment mutés chez les isolats VHC-1b se situent au niveau des codons 2367, 2372, 2375 et 2378 (figure 23b, p. 76). La substitution V2360A est présente chez les 2 patients non répondeurs infectés par le génotype 1b du VHC, tandis qu'elle est absente chez les 2 répondeurs partiels infectés par le même génotype. Aucune corrélation significative n'a été observée entre la médiane du nombre de substitutions globales, non synonymes et non conservées calculées dans la région V3 en prétraitement et la réponse au traitement (tableau XVII, p. 72).

L'étude des séquences en nucléotides et en acides aminés de la région ISDR, localisée entre les codons 2209-2248, fut réalisée chez tous les patients de l'étude. La majorité des

substitutions d'acides aminés sont survenues aux codons 2217 et 2218 qui consistent en des attributs permettant d'établir une variation entre les souches VHC-1a et VHC-1b de type sauvage (figure 23a, p. 75). En général, la séquence en acide aminée de cette région est très conservée, quoiqu'on observe quelques substitutions non synonymes et non conservées distribuées de façon aléatoire parmi les 24 isolats à l'étude. Six des 7 patients (85,7%) présentant une réponse soutenue à la bithérapie ont la substitution A2217T, alors qu'elle est perçue chez 1 ETR sur 4 (25%) et chez 4 des 8 NR (50%). Parmi les isolats 1b, l'histidine en position 2218 est substituée par une arginine chez 3 des 4 patients infectés par le VHC-1b.

Parmi les 23 codons qui constituent la portion terminale du domaine de fixation à la PKR, aucune différence n'a été décelée quant au nombre total de mutations entre les répondeurs soutenus et non répondeurs (tableaux XV-XVI, p. 70-71). Les substitutions d'acides aminés les plus fréquentes sont issues du changement d'une isoleucine pour une valine aux codons 2252 et 2268 pour le génotype 1a, alors qu'elles sont localisées aux codons 2259, 2262 et 2268 chez les isolats VHC-1b (figure 23a, p. 75).

▪ **Sérine protéase NS3**

Il y a 543 nucléotides qui encodent le gène de la sérine protéase NS3. Les séquences de 24 patients infectés par le génotype 1 du VHC ont été analysées afin de déterminer la distribution nucléotidique à chaque position en comparaison avec les séquences consensus dérivées des patients et les prototypes VHC-1 provenant de Genbank (VHC-1 et VHC-J, respectivement). Pour les isolats appartenant au génotype 1a du VHC, 159 positions contiennent une ou plusieurs substitutions de nucléotides lorsque comparées au prototype VHC-1, résultant en une variation globale de 29,3% (données non présentées). Lorsque comparées à la séquence majoritaire, 17 positions sont différentes, résultant en une variation globale de 3,1%. Pour les souches du VHC-1b, 106 positions présentent une ou plusieurs substitutions de nucléotides lorsque comparées au prototype HCV-J, ce qui génère une variation globale de 19,5%. Toutefois, il y a 34 positions qui varient au niveau de la séquence consensus des patients (variation globale de 6,3%). Aucune insertion ou délétion ne fut détectée parmi les séquences analysées. De par l'utilisation d'une *Taq* DNA polymérase dotée d'une activité 3'-5' exonucléase pour la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN

(taux d'erreur $\approx 4,8 * 10^{-6}$), les résultats présentés ci-joints semblent dresser un portrait exact des variations génétiques naturelles du génome viral.

La sérine protéase NS3 est composée de 181 acides aminés. Les effets que peuvent induire des substitutions nucléotidiques sur les séquences en acides aminés ont démontré que la majorité de ces substitutions sont silencieuses. Une séquence consensus a été déterminée, respectivement, pour les 20 isolats VHC-1a et les 4 isolats VHC-1. Le prototype 1a (VHC-1) diffère de la séquence majoritaire provenant des patients par 3 résidus (Q80K, S91A et N174S), représentant une variation totale entre les séquences de 1,7% (figure 24a, p. 77-78). Aucun codon n'a présenté plus de deux types d'acides aminés différents. Parmi les 15 sites présentant des substitutions sporadiques d'acides aminés, 10 sites ont des substitutions présentes chez un seul patient. Pour les patients infectés par le génotype 1b du VHC, la séquence consensus diffère du prototype 1b (VHC-J) par 8 positions (S7A, D30E, L36V, P86Q, M94L, V114L, V150A et I164V), représentant une variation globale de 4,4% (figure 24b, p. 78). Quatre sites présentent des substitutions retrouvées chez un seul patient parmi les 5 sites arborant des substitutions sporadiques.

La sérine protéase NS3 est repliée avec une triade catalytique formée des acides aminés suivants : l'histidine à la position 57, l'acide aspartique à la position 81 et la sérine en position 139. Les séquences analysées du domaine sérine protéase NS3_{1027-1207a.a.} chez les 24 isolats infectés par les génotypes 1a et 1b du VHC contiennent la triade catalytique qui est cruciale pour l'activité enzymatique de NS3. Chez les variants 1a, il n'y a aucune substitution dans la triade catalytique His-57, Asp-81 et Ser-139. Toutefois, un changement significatif à proximité du résidu Asp81 est présent parmi 6 répondeurs soutenus (85,7%), 4 répondeurs partiels (80,0%) et 5 non répondeurs (62,5%) : il s'agit de la substitution d'une glutamine en position 80 pour une lysine. Les sites présumés de liaison de l'enzyme aux substrats (L135, F154, A157, R161 et K165), ainsi que le motif GXSGG entourant le codon 139, sont conservés. Il en va de même pour le site de chélation du zinc (cystéine 97, 99, 145 et histidine 149) et le site de positionnement du cofacteur NS4A (isoleucine 3). Deux autres sites du domaine sérine protéase sont fortement variables. La sérine en position 91 est substituée par une alanine (substitution non conservée) chez 11 patients (3 SVR, 3 ETR et 5 NR) et par une thréonine chez 1 répondeur partiel (ETR), alors que la substitution en position 174 d'une asparagine pour une sérine (substitution conservée) est retrouvée chez 4

répondeurs soutenus, 2 répondeurs partiels et 5 non répondeurs. Chez les isolats 1b, aucune mutation n'est perçue au niveau des positions 57, 81 et 139, alors que des substitutions importantes sont localisées à proximité des 3 résidus définissant la triade catalytique (Y56F, P86Q, A87S et I132V). Le site de liaison de l'enzyme aux substrats, ainsi que le site de chélation du zinc, sont conservés entre les isolats, mais des substitutions d'acides aminés se trouvent également à leur proximité, soient celles aux positions 132 (I→V), 150 (V→A) et 164 (I→V). Un seul patient présente une substitution en position 3 (I→V), correspondant au résidu aminé de NS3 qui interagit avec le cofacteur NS4A.

La variabilité du gène NS3 a été évaluée en prétraitement par comparaison de la médiane du nombre de mutations globales, non synonymes et non conservées entre les répondeurs soutenus, partiels et non répondeurs (tableau XVIII, p. 73). Le nombre de substitutions nucléotidiques globales est significativement supérieur chez les non répondeurs (P groupe 1 = 0,042) et chez les répondeurs partiels et non répondeurs combinés (P groupe 2 = 0,013). Cette corrélation n'est toutefois pas observée au niveau des substitutions globales d'acides aminés dans le domaine sérine protéase (P groupe 1 = 0,841; P groupe 2 = 0,260).

A) Glycoprotéine E2

Tableau XII : Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région HVR2 de E2 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^{a,b} ou P value ^c	Nb. de patients	HVR2 ₄₇₄₋₄₈₂ a.a. ^{d,e,f}							
		Mutations globales		Mutations non synonymes		Mutations non conservées			
		nt	a.a.	nt	a.a.	nt	a.a.		
1 (SVR) (ETR + NR)	7 17	5 (3,5-12) 4 (3-12)	2 (2-6) 2 (2-6)	1 (1-2) 1 (1-2,3)	1 (1-2) 1 (1-1,3)	2 (0,5-7) 1,3 (0,8-6,5)	2 (1-4) 1 (1-4)		
P		0,820	0,974	0,671	0,624	0,671	0,922		
2 (SVR + ETR) (NR)	14 10	5 (3-12) 4 (3-10,8)	2 (2-6) 2 (2-5,5)	1 (1-2) 1 (1-2)	1 (1-2) 1 (1-1)	2 (1-7) 1 (0,3-5,9)	2 (1-4) 1 (1-3,8)		
P		0,693	0,784	0,976	0,648	0,522	0,738		

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR ; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c déterminé par Mann-Whitney rank-sum test. ^d HVR2₄₇₄₋₄₈₂ a.a., région hypervariable 2 selon Kato et al. (1992). ^e nt, nucléotide ; a.a., acide aminé. ^f les données correspondent à la médiane du nombre de substitutions (25^e-75^e percentile).
 Note: La région E2 excluant HVR1 n'a pu être amplifiée chez le patient 31 (ETR).

Tableau XIII : Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région CD81-1 de E2 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^{a,b} ou <i>P</i> value ^c	Nb. de patients	CD81-1 ^d 474-494 a.a. ^{d,e,f}											
		Mutations globales		Mutations non synonymes		Mutations non conservées							
		nt	a.a.	nt	a.a.	nt	a.a.						
1 (SVR) (ETR + NR)	7	8 (7,5-20,5)	2 (2-8)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (0,5-10)	2 (1-6)	7 (5-16,5)	3 (2-7)	2 (1-2,3)	1 (1-2)	1,3 (0,8-6,6)	1 (1-5,3)
<i>P</i>		0,376	0,820	0,535	0,769	0,671	0,820						
2 (SVR + ETR) (NR)	14	8 (6-20)	2 (2-8)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-10)	2 (1-6)	7 (5,3-15)	3 (2-6,3)	2 (1-2)	1 (1-2)	1 (0,3-6,3)	1 (1-5,3)
<i>P</i>		0,693	0,879	0,879	0,605	0,522	0,832						

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR ; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c déterminé par Mann-Whitney rank-sum test. ^d CD81-1^d 474-494 a.a., région de liaison 1 à CD81 décrite par Yagnik *et al.* (2001). ^e nt, nucléotide ; a.a., acide aminé. ^f Les données correspondent à la médiane du nombre de substitutions (25^e-75^e percentile).
Note: La région E2 excluant HVR1 n'a pu être amplifiée chez le patient 31 (ETR).

Tableau XIV : Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région CD81-2 de E2 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^{a,b} ou P value ^c	Nb. de patients	CD81-2 ^{522-551aa} d ^{e,f}					
		Mutations globales		Mutations non synonymes		Mutations non conservées	
		nt	a.a.	nt	a.a.	nt	a.a.
1 (SVR)	7	13 (12,5-20,5)	5 (4-5,5)	3 (2,5-4)	3 (2,5-4)	3 (1,5-3)	2 (1,5-2)
(ETR + NR)	17	14 (10,5-16)	4 (3-5,3)	3 (2-4)	3 (1-4)	1,8 (1-3,1)	1,5 (1-2)
<i>P</i>		0,671	0,535	0,413	0,452	0,974	0,720
2 (SVR + ETR)	14	13 (11-20)	5 (3-5)	3 (2-4)	3 (2-4)	2 (1-3)	2 (1-2)
(NR)	10	14 (11,3-16)	4,5 (3-5,8)	3 (2-3,8)	3 (1-3,8)	2,5 (1,1-3)	2 (1-2)
<i>P</i>		0,976	0,976	0,693	0,605	0,784	0,605

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR ; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c déterminé par Mann-Whitney rank-sum test. ^d CD81-2⁵²²⁻⁵⁵¹ a.a., région de liaison 2 à CD81 décrite par Yagnik *et al.* (2001). ^e nt, nucléotide ; a.a., acide aminé. ^f les données correspondent à la médiane du nombre de substitutions (25^e-75^e percentile).
 Note: La région E2 excluant HVR1 n'a pu être amplifiée chez le patient 31 (ETR).

B) Protéine NS5A

Tableau XV : Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région ISDR de NS5A entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^{a,b} ou <i>P</i> value ^c	Nb. de patients	ISDR ₂₂₀₉₋₂₂₄₈ a.a. ^{d,e,f}											
		Mutations globales		Mutations non synonymes		Mutations non conservées							
		nt	a.a.	nt	a.a.	nt	a.a.						
1 (SVR) (ETR + NR)	7 17	10 (8,5-10,5)	2 (1,5-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (1-1,5)	1 (1-1,5)	9 (7,8-10)	1 (0-2)	0 (0-0,3)	0	1 (0-1,1)	1 (0-1,3)
<i>P</i>		0,535	0,154	0,535	0,376	0,341	0,341	0,784	0,784	0,976	0,693	0,976	0,927
2 (SVR + ETR) (NR)	14 10	10 (8-10)	1 (1-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-1)	9 (8,3-9,8)	1 (0,3-2)	0 (0-0,8)	0	1 (0,1-1,8)	1 (0-1,8)
<i>P</i>		0,784	0,784	0,976	0,693	0,976	0,927						

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR ; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c déterminé par Mann-Whitney rank-sum test. ^d ISDR₂₂₀₉₋₂₂₄₈ a.a., *interferon-sensitivity determining region* décrite par Enomoto et al. (1995). ^e nt, nucléotide ; a.a., acide aminé. ^f les données correspondent à la médiane du nombre de substitutions (25^e-75^e percentile).
Note: La région NS5A n'a pu être amplifiée chez le patient 32 (ETR).

Tableau XVI : Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans le domaine de fixation à PKR de NS5A entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^{a,b} ou <i>P</i> value ^c	Nb. de patients	PKR binding-domain ²²⁰⁹⁻²²⁷⁴ a.a. ^{d,e,f}					
		Mutations globales		Mutations non synonymes		Mutations non conservées	
		nt	a.a.	nt	a.a.	nt	a.a.
1 (SVR)	7	13 (11,5-17,5)	2 (2-3,5)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)
(ETR + NR)	17	13 (10,8-20)	3 (1-4)	1 (0,8-2,3)	1 (0,8-2)	1 (0-2)	1 (0-2)
<i>P</i>		0,974	0,769	0,871	0,922	0,679	0,535
2 (SVR + ETR)	14	13 (11-19)	2 (1-4)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (0-2)	1 (0-2)
(NR)	10	13 (10,3-19,3)	3 (1,3-3,8)	1,5 (0,3-2,8)	1,5 (0,3-2,8)	1 (0,6-2)	1 (0,3-2)
<i>P</i>		0,879	0,879	0,693	0,648	0,832	0,927

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR ; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c déterminé par Mann-Whitney rank-sum test. ^d PKR²²⁰⁹⁻²²⁷⁴ a.a., PKR binding domain décrit par Gale et al. (1997). ^e nt, nucléotide ; a.a., acide aminé, ^f les données correspondent à la médiane du nombre de substitutions (25^e-75^e percentile).
 Note: La région NS5A n'a pu être amplifiée chez le patient 32 (ETR).

Tableau XVII : Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans la région V3 de NS5A entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^{a,b} ou P value ^c	Nb. de patients	V3 ₂₃₅₆₋₂₃₇₉ a.a. ^{d,e,f}					
		Mutations globales		Mutations non synonymes		Mutations non conservées	
		nt	a.a.	nt	a.a.	nt	a.a.
1 (SVR) (ETR + NR)	7 17	10 (7-12)	4 (1,5-5)	0	0	4,5 (2,5-5)	4 (1,5-5)
		11 (8,8-13,3)	3,5 (2-5)	0 (0-0,5)	0 (0-1)	4 (2-5,3)	3 (2-5)
<i>P</i>		0,579	0,922	0,452	0,535	0,871	0,820
2 (SVR + ETR) (NR)	14 10	10 (8-12)	5 (2-5)	0	0	5 (2-5)	5 (2-5)
		11 (9,3-12,5)	3 (2-4,8)	0 (0-0,5)	0 (0-1)	3,5 (2-4,8)	3 (2-3,8)
<i>P</i>		0,648	0,693	0,563	0,343	0,548	0,373

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR ; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c déterminé par Mann-Whitney rank-sum test. ^d V3₂₃₅₆₋₂₃₇₉ a.a., région hypervariable 3 décrite par Inchauspe et al. (1991). ^e nt, nucléotide ; a.a., acide aminé. ^f les données correspondent à la médiane du nombre de substitutions (25^e-75^e percentile).
 Note: La région NS5A n'a pu être amplifiée chez le patient 32 (ETR).

C) Protéine NS3

Tableau XVIII : Comparaison de la médiane du nombre total de substitutions dans le domaine sérine protéase de NS3 entre 3 groupes de patients à l'étude (SVR, ETR et NR) suivant deux types d'analyse

Groupes ^a ou P value ^c	Nb. de patients	sérine protéase NS3 ¹⁰²⁷⁻¹²⁰⁷ a.a. ^{d,e,f}					
		Mutations globales		Mutations non synonymes		Mutations non conservées	
		nt	a.a.	nt	a.a.	nt	a.a.
1 (SVR)	7	32 (28-34)	2 (2-3,5)	2 (1,8-2,5)	1 (0,5-1)	3 (2-3)	1 (1-3)
(ETR + NR)	17	41 (35-48)	3 (2-6)	2 (2-3,5)	1 (1-2)	2 (2-3)	2 (1-3)
<i>P</i>		0,013	0,260	0,494	0,209	0,418	0,757
2 (SVR + ETR)	14	34 (28,3-43,8)	2,5 (2-6)	2 (2-3,4)	1 (1-1,8)	2 (2-3)	1,5 (1-3,5)
(NR)	10	41,5 (35,3-47,5)	3 (2,3-4)	2 (2-3)	1 (1-2)	2 (2-2,8)	2 (1-2,8)
<i>P</i>		0,042	0,841	0,977	0,886	0,437	0,977

^a SVR, réponse virologique soutenue; ETR, réponse virologique initiale suivie d'une rechute; NR, absence de réponse au traitement. ^b Groupe 1 : SVR vs ETR + NR; Groupe 2 : SVR + ETR vs NR. ^c déterminé par Mann-Whitney rank-sum test. ^d Sérine protéase NS3¹⁰²⁷⁻¹²⁰⁷ a.a. décrite par Eckart et al. (1993). ^e nt, nucléotide; a.a., acide aminé. ^f les données correspondent à la médiane du nombre de substitutions (25^e-75^e percentile).

A

B

	HVR2										
	474	482	482	494	494		522	522	551	551	
VHC-1a	Y A N G S G P D Q	R P Y C W H Y	P P K P C	S G A P T Y S W G E N D T D V F V L N N T R P P L G N W F G							
SVR4	V K P D S L	A . Q	SVR4	V	E	L L	Q				
SVR7	V K P D S L	A . Q	SVR7	V	N	E	L L	Q			
SVR8	V K P D S L	A . Q	SVR8	V	N	E	L L	Q			
SVR10	SVR10	L	N	S			
SVR11	H	E	SVR11	N	E			
SVR13	V	SVR13	N	G	E	L			
SVR20	H	SVR20	L	V	N	D	H			
ETR3	V K P D S L	A . Q	ETR3	N	E	E	L L	Q		
ETR15	F T	ETR15	A	V	N	E	M		
ETR19	E	ETR19	A		
ETR32	H T	ETR32	V	N	M		
NR1	V K P D S L	A . Q	NR1	V	N	E	L L	Q		
NR2	H	E	NR2	A	V	F T	V	L I		
NR5	V K P D S L	A . Q	NR5	V	N	E	L L	Q		
NR9	H	NR9	L	V	N	A S		
NR14	E H	NR14	A	V	N	G	Y	L		
NR17	E H	NR17	N	S	L		
NR22	H	E	NR22	N	A		
NR30	H	E	NR30		
VHC-1b	H D M P E S S D Q	R P Y C W H Y	A P R P C	F G A P T Y S W G E N E T D V L L L S N T R P P Q G N W F G							
ETR26	Y T E . T N L	ETR26	V	R	N		
ETR29	Y A E . S D . V	K	ETR29	T	T	A		
NR18	Y A E . S	NR18	H	T	A	N		
NR28	Y A E . R D V	NR28	V	T	A		

Figure 22 : Alignements de séquences en acides aminés correspondant aux régions CD81-1 (A), comprenant le domaine HVR2₄₇₄₋₄₈₂ aa, et CD81-2 (B) de la glycoprotéine E2, soient des acides aminés 474-494 et 522-551 de la polyprotéine du VHC, chez des patients en prétraitement infectés par le VHC-1a et VHC-1b.

A

ISSDR

VHC-1a

2209 P S L K A T C T A N H D S P D A E L I E A N L I L W R Q E M G N I T R V E S E N 2248

K V V I L D S F D P L V A E E D E R E I S V P A E I 2274

SVR4
SVR7
SVR8
SVR10
SVR11
SVR13
SVR20

. L
. T
. T
. T
. T
. T
. T

V
E
V
V
V
V
V

ETR3
ETR15
ETR19
ETR31

. T
.
.
.

V
V
V
V

NR1
NR2
NR5
NR9
NR14
NR17
NR22
NR30

. H
. T K
. R
. T A
. T
. I
.
.

E
V
V
V
V
V
V
V

VHC-1a

2209 P S L K A T C T T H H D S P D A D L I E A N L I L W R Q E M G N I T R V E S E N 2248

K V V I L D S F D P I R A V E D E R E I S V P A E I 2274

ETR26
ETR29
NR18
NR28

. R
. R
. R
. R

L
L
L
L

B

VHC-1a	2356	S T S G I T G D N T T T S S E P A P S G C P P D	2379
SVR4	 K Q	
SVR7	 K T S P	
SVR8	 A . L	
SVR10		L A D P V	
SVR11		. .	
SVR13	 A D A A D S R	
SVR20	 S A L . V R	
ETR3	 D T . P A . L	
ETR15	 S A T S P	
ETR19	 A D	
ETR31		. .	
NR1	 V D A . E T . P	
NR2		. .	
NR5		. .	
NR9	 P S	
NR14	 A I . S	
NR17	 S V A S	
NR22		. .	
MR30	 S . P L	
VHC-1b	2356	G S S A V D S G T A T G P P D Q A S D D G D K G	2379
ETR26	 S A P L . N T	
ETR29		E A S T	
NR18	 A V A P N A	
NR28		E A A P P T	

Figure 23 : Alignements de séquences en acides aminés correspondant aux régions du domaine de fixation à PKR de la protéine NS5A (A), incluant le domaine ISDR₂₂₀₉₋₂₂₄₈ a.a. et V3 (B), soient des acides aminés 2209-2274 et 2356-2379 de la polypeptéine du VHC, chez des patients en prétraitement infectés par le VHC-1a et VHC-1b.

A

```

1027 VHC-1a . . . . . 1086
VHC-Cons . . . . .
SVR4 . . . . .
SVR7 . . . . . F . . . . .
SVR8 . . . . .
SVR10 . . . . .
SVR11 . . . . .
SVR13 . . . . .
SVR20 . . . . .
ETR3 . . . . .
ETR15 . . . . . V . . . . .
ETR19 . . . . .
ETR31 . . . . .
ETR32 . . . . .
NR1 . . . . . V . . . . .
NR2 . . . . .
NR5 . . . . .
NR9 . . . . .
NR14 . . . . .
NR17 . . . . .
NR22 . . . . .
NR30 . . . . .

```

```

1087 VHC-1a . . . . . 1146
VHC-Cons . . . . .
SVR4 . . . . . K . . . . .
SVR7 . . . . . K . . . . .
SVR8 . . . . . K . . . . .
SVR10 . . . . . S . . . . . L . . . . .
SVR11 . . . . .
SVR13 . . . . .
SVR20 . . . . .
ETR3 . . . . .
ETR15 . . . . . A . . . . .
ETR19 . . . . .
ETR31 . . . . .
ETR32 . . . . .
NR1 . . . . .
NR2 . . . . .
NR5 . . . . . A . . . . .
NR9 . . . . .
NR14 . . . . . S . . . . .
NR17 . . . . .
NR22 . . . . .
NR30 . . . . .

```

```

1147
VHC-1a  D S R G S L L S P R P I S Y L K G S S G G P L L C P A G H A V G I F R A A V C T R G V A K A V D F I P V E N L E T T M R S 1207
VHC-Cons . . . . .
SVR4 . . . . .
SVR7 . . . . .
SVR8 . . . . .
SVR10 . . . . .
SVR11 . . . . .
SVR13 . . . . .
SVR20 . . . . .
ETR3 . . . . .
ETR15 . . . . .
ETR19 . . . . .
ETR31 . . . . .
ETR32 . . . . .
NR1 . . . . .
NR2 . . . . .
NR5 . . . . .
NR9 . . . . .
NR14 . . . . .
NR17 . . . . .
NR22 . . . . .
NR30 . . . . .

```

B

```

1027
VHC-1b  A P I T A Y S Q Q T R G L L G C I I T S L T G R D K N Q V D G E V Q V L S T A T Q S F L A T C V N G V C W T V Y H G A G 1086
VHC-Cons . . . . .
ETR26 . . . . .
ETR29 . . . . .
NR18 . . . . .
NR28 . . . . .
1087
VHC-1b  S K T L A G P K G P I T Q M Y T N V D Q D L V G W P A P P G A R S M T P C T C G S S D L Y L V T R H A D V V P V R R R G 1146
VHC-Cons . . . . .
ETR26 . . . . .
ETR29 . . . . .
NR18 . . . . .
NR28 . . . . .
1147
VHC-1b  D S R G S L L S P R P I S Y L K G S S G G P L L C P S G H V V G I F R A A V C T R G V A K A V D F I P V E S M E T T M R S 1207
VHC-Cons . . . . .
ETR26 . . . . .
ETR29 . . . . .
NR18 . . . . .
NR28 . . . . .

```

Figure 24 : Alignements de séquences en acides aminés correspondant au domaine sérine protéase de NS3, soient des acides aminés 1027-1207 de la polyprotéine du VHC, chez des patients en prétraitement infectés par le VHC-1a (A) et VHC-1b (B).

Discussion

Dans cette présente étude, nous avons tenté de déterminer le rôle des facteurs viraux et de l'hôte dans la réponse à la bithérapie antivirale à partir d'une cohorte de 24 patients chroniquement infectés par le génotype 1 du VHC. Le faible nombre de patients analysés jusqu'à présent s'explique par les difficultés encourues lors du recensement qui s'est échelonné sur une période de deux ans, soit de septembre 2003 à juillet 2005. En effet, parmi les 33 patients qui se sont enrôlés durant cette période, 4 patients ont cessé le traitement dû à des effets secondaires indésirables, 1 patient ne s'est pas présenté lors de son prélèvement sanguin en prétraitement (temps 0), 1 patient dont le suivi a été cessé dû à un déménagement, 2 patients ont refusé de subir des prélèvements pour les fins de l'étude et 1 patient est décédé durant la période de traitement. De surcroît, la majorité des patients recrutés ont une histoire d'alcoolisme et de toxicomanie, ce qui rend d'autant plus difficile la compliance au traitement et la présence ponctuelle aux rendez-vous de suivi. La survenue de difficultés d'ordre technique, de par l'instabilité de l'ARN viral et la faible quantité de plasma prélevée pour les fins de l'étude, ont également créé des embûches tout au long de ce projet. C'est ainsi pour ces raisons que nous avons procédé à deux types d'analyse pour l'évaluation des divers paramètres analysés afin de pallier à ce problème. Deux groupes de patients ont été formés afin d'évaluer en prétraitement l'influence des facteurs viraux et de l'hôte sur la réponse virologique à la bithérapie antivirale (groupe 1 : répondeurs soutenus (SVR) versus répondeurs partiels (ETR) + non répondeurs (NR); groupe 2 : répondeurs soutenus (SVR) + répondeurs partiels (ETR) versus non répondeurs (NR)).

Efficacité du régime thérapeutique

Le pourcentage obtenu (29,2%) de patients présentant une réponse virologique soutenue à 72 semaines, soit 6 mois suivant l'arrêt du traitement, est généralement inférieur aux résultats présentés dans de larges études menées avec l'interféron α -2b pégylé et la ribavirine. Dans ces travaux, le taux de réponse virologique soutenue à 72 semaines varie entre 39-42% chez les patients infectés par le génotype 1 et recevant des doses d'IFN pégylé et de ribavirine comparables à celles administrées dans cette étude (Lindsay *et al.* 2001; Manns *et al.* 2001). L'absence de réponse à la bithérapie pourrait s'expliquer par le fait que

plus de 50% des patients de cette étude n'étaient pas naïfs au traitement, par une dose insuffisante du médicament, un niveau élevé de réplication virale, la présence de souches virales résistantes aux effets immunologiques du traitement ou simplement par le faible nombre de patients analysés en comparaison aux études mentionnées ci haut.

Facteurs de l'hôte

Plusieurs caractéristiques démographiques et cliniques de l'hôte infecté, dont l'âge avancé, le sexe masculin, la race (Africains et Hispaniques), certains comportements à risque (alcoolisme et usage de drogues injectables), un degré avancé de fibrose hépatique et la cirrhose compensée, sont associées à de faibles taux de réponse à la thérapie antivirale (Fried *et al.* 2002; Manns *et al.* 2001; McHutchison *et al.* 1998; Schiff E.R., 1999; Thorpe *et al.* 2002). D'après les résultats obtenus pour les 2 groupes de patients, le stade histologique, la race et le niveau d'ALT sérique ne sont pas des facteurs prédictifs de la réponse au traitement. Néanmoins, les facteurs tels que le jeune âge, le sexe féminin et le faible grade histologique sont associés à une meilleure réponse à la thérapie antivirale, bien que les résultats soient à la limite du seuil de signification. Ainsi, seul le statut thérapeutique est corrélé de façon significative au pronostic clinique à 72 semaines. Il est clairement établi que la nature de quasi-espèces du VHC lui confère un avantage significatif pour sa survie puisque la présence simultanée de multiples variants génomiques et l'émergence continue de nouveaux variants permettent aux mutants les mieux adaptés à l'environnement d'être sélectionnés (Pawlotsky *et al.* 1999). L'IFN- α et la ribavirine ne ciblent pas directement les composantes fonctionnelles ou les gènes du VHC, mais potentialisent les réponses immunitaires antivirales de l'hôte qui, en contrepartie, exercent des pressions au niveau de diverses régions génomiques virales, protéines et épitopes. Il semble que l'administration de l'IFN suivie du retrait de celui-ci génère un déséquilibre de la quasi-espèce par retrait abrupt des pressions induites par la molécule antivirale, ce qui a pour résultante d'induire des changements drastiques dans l'environnement de l'hôte et, de surcroît, des changements qualitatifs importants dans la composition de la quasi-espèce. La sélection de variants résistants aux mécanismes immunitaires et antiviraux de l'hôte, observée après un échec à l'IFN, pourrait expliquer l'absence de réponse thérapeutique favorable chez les patients en retraitement (Polyak *et al.* 1998).

Facteurs viraux

En ce qui a trait aux facteurs viraux, aucune corrélation positive n'a été identifiée entre la charge virale pré-thérapeutique élevée (> 2 000 000 copies/ml) et l'échec au traitement antiviral, alors que ce fut observé précédemment dans les travaux de Tsubota *et al.* (1994). Ceci pourrait peut-être s'expliquer par une présélection de quelques variants viraux résistants aux effets immunomodulateurs de l'interféron avant l'initiation du traitement, conférant ainsi une résistance au VHC indépendamment de sa charge virale pré-thérapeutique. Sachant d'emblée que les génotypes 1 et 4, particulièrement le VHC-1b, sont des facteurs prédictifs indépendants et significatifs d'un faible taux de sensibilité à la bithérapie par rapport aux génotypes 2 ou 3, il était intéressant de comparer un ensemble de patients infectés par l'un des deux sous-types du VHC-1 (Anonyme, 1999; Davis *et al.* 1998; McHutchison *et al.* 1998; Newmann *et al.* 2002; Poynard *et al.* 1998; Simmonds P., 1997). Puisqu'on ne compte que 4 patients (16,7%) infectés par le génotype 1b au sein de la cohorte à l'étude, il n'a pas été possible d'établir un rapport entre ce dernier et l'absence de réponse thérapeutique.

Quasi-espèces HVR1

La région hypervariable 1 (HVR1), localisée dans la portion amino-terminale du gène E2, est considérée comme la cible majeure d'anticorps par présence d'épitopes antigéniques et son niveau élevé de variabilité résulte de pressions sélectives exercées par le système immunitaire de l'hôte infecté (van Doorn *et al.* 1995). L'accumulation de changements dans cette région permettrait au virus d'échapper aux anticorps neutralisants ou à d'autres mécanismes immunitaires humoraux (Farci *et al.* 1994; Farci *et al.* 2000; Kato *et al.* 1994; Weiner *et al.* 1992). Il a été démontré que la résolution d'une infection aiguë à VHC est associée à une stase évolutive, alors que la progression vers une hépatite virale chronique est corrélée avec l'évolution génétique des quasi-espèces HVR1 (Farci *et al.* 2000). De surcroît, HVR1 subit de fréquentes substitutions nucléotidiques non synonymes au cours d'une infection persistante et sous thérapie à l'IFN (Farci *et al.* 2000; Kato *et al.* 1992; Weiner *et al.* 1992). Plusieurs études ont démontré une corrélation entre un degré élevé d'hétérogénéité au sein des quasi-espèces HVR1 et de faibles taux de réponse à l'IFN- α chez les patients infectés chroniquement par le VHC (Gonzalez-Peralta *et al.* 1996; Okada *et*

al. 1992; Pawlotsky *et al.* 1998b; Shindo *et al.* 1996); toutefois, une telle association n'a pas été observée dans d'autres études (Lopez-labrador *et al.* 1999; Sandres *et al.* 2000).

Nul doute que les facteurs viraux semblent jouer un rôle important dans la résistance du VHC à l'IFN, possiblement en conférant aux quasi-espèces et aux cellules infectées les propriétés leur permettant de survivre au sein d'un hôte sous traitement. Une complexité génétique élevée des quasi-espèces (i.e., large répertoire de quasi-espèces) en début de traitement est un facteur prédictif indépendant de l'échec thérapeutique (Pawlotsky *et al.* 1998a; Pawlotsky *et al.* 1998b; Toyoda *et al.* 1998). En contraste, un petit répertoire de quasi-espèces en prétraitement est perçu chez les patients présentant une réponse virologique prolongée à l'IFN. En se basant sur l'hypothèse qu'un degré élevé d'hétérogénéité des quasi-espèces du VHC en prétraitement est un facteur pouvant moduler l'obtention d'une réponse virologique soutenue subséquentement à l'administration d'une bithérapie combinant l'interféron α -2b pégylé et la ribavirine, nous avons tenté d'observer la relation entre la complexité génétique à deux instances, soient en nucléotides et en acide aminés, de la région HVR1 et le pronostic clinique à 24 semaines post-traitement (72 semaines). Quoique l'on constate que la complexité génétique (i.e. nombre total de variants viraux identifiés dans un seul prélèvement) en nucléotides, ainsi qu'en acide aminés, est plus faible chez les SVR du groupe 1 et les SVR + ETR du groupe 2 que chez les NR (groupe 2), la différence n'est toutefois pas significative. L'étude de la diversité génétique (i.e. distance génétique moyenne entre les différents variants viraux) en prétraitement pour la région HVR1 n'a pu démontrer de différences significatives entre les répondeurs soutenus et non répondeurs, bien qu'une plus faible diversité nucléotidique est apparente chez les SVR + ETR (2^e groupe) et qu'elle est associée à un taux plus faible de substitutions synonymes et non synonymes que chez les NR. Pour les régions situées à l'extérieur du domaine HVR1 de la glycoprotéine E2, aucune corrélation significative n'a été observée entre les SVR et les NR, quoique ceux-ci présentent une diversité génétique légèrement plus faible pour l'ensemble des régions que les patients présentant une réponse virologique prolongée. Il est possible que la région HVR1 ait fortement évolué dans cette cohorte de par l'infection chronique et les pressions immunitaires et que ce ne soit pas un indicateur sensible de la survenue d'une réponse à la bithérapie en fin de traitement (Chambers *et al.* 2005). Les travaux de Chen et Weng (2005) ont démontré que la complexité génétique et diversité

génétique des quasi-espèces, ainsi que la sélection positive du domaine HVR1 via le système immunitaire de l'hôte, seraient associés à la persistance du VHC. Toutefois, les travaux de Farci *et al.* (2002) ont démontré que la complexité et la diversité génétique avant traitement ne sont pas corrélés à la réponse au traitement, mais plutôt que l'émergence précoce et la dominance d'un seul variant présent avant l'initiation de la bithérapie distingue les patients qui vont présenter une réponse virologique soutenue au traitement de ceux qui expérimentent subséquemment une rechute ou un échec thérapeutique. Dans l'étude menée par Bartosch *et al.* (2005), ils ont démontré que la présence de substitutions non conservées au sein d'acides aminés conservés de la région HVR1 aurait un effet dramatique sur la potentialisation de l'infection, suggérant que la diversification de HVR1 pourrait compromettre l'évasion immunitaire et la promotion de l'entrée du VHC. Quoique l'étude ait été réalisée *in vitro* à partir de pseudo particules du VHC, un tel phénomène pourrait se refléter *in vivo* au niveau du degré d'hétérogénéité des quasi-espèces du VHC chez les patients infectés sous traitement antiviral.

L'importance que peut avoir l'hétérogénéité des quasi-espèces du VHC à l'extérieur de la région HVR1, chez les patients infectés chroniquement par le VHC, est inconnue. Dans la présente étude, la diversité génétique de différentes régions de la glycoprotéine d'enveloppe 2 a été analysée en fonction du pronostic thérapeutique des patients. Les régions de E2, excluant HVR1, illustrent un écart plus important au sein des distances génétiques entre les patients répondeurs et non répondeurs. En contrepartie, l'absence d'un taux plus élevé de substitutions non silencieuses et d'une diversité génétique plus importante chez les non répondeurs ne permet pas d'affirmer que la région HVR1, et possiblement les autres régions analysées de E2 (Chen et Wang, 2005), sont soumises à des pressions de sélection par le système immunitaire de l'hôte, ce qui promouvoit l'apparition d'une population hétérogène du VHC associée à la persistance virale (Farci *et al.* 1994; Farci *et al.* 1996; Farci *et al.* 2002; Kato *et al.* 1994; Weiner *et al.* 1992). Une diversité génétique plus importante, observée chez les SVR et SVR + ETR par comparaison aux NR, est en accord avec notre hypothèse de départ; l'accumulation de mutations dans les régions HVR2, CD81-1 et CD81-2 pourrait moduler l'interaction de la glycoprotéine E2 avec son ligand cellulaire et ainsi favoriser une réponse soutenue au traitement. Toutefois, l'obtention de résultats

statistiquement significatifs sera nécessaire suivant l'évaluation d'une plus grande cohorte de patients afin de confirmer cette hypothèse.

Glycoprotéine E2

Le VHC use de diverses stratégies afin d'échapper aux effets antiviraux de l'interféron alpha. Il a été démontré que l'administration d'IFN- α (avec ou sans ribavirine) induit une régulation négative du niveau d'expression du récepteur de surface cellulaire CD81 chez les patients infectés chroniquement par le VHC (Kronenberger *et al.* 2001). En présumant que le (co) récepteur CD81 est requis pour l'attachement et l'adsorption du virus, une diminution de son expression durant le traitement à l'IFN pourrait diminuer le taux d'infection de cellules permissives. Ainsi, les différentes capacités de liaison de la glycoprotéine E2 avec la molécule CD81, de par la présence de mutations au sein des régions de liaison à CD81, seraient possiblement impliquées dans les mécanismes de résistance à l'IFN- α . Dans ce projet, nous avons investigué trois régions de la glycoprotéine de surface à partir de séquences du gène E2 provenant d'isolats VHC-1a et VHC-1b en prétraitement. En somme, aucune corrélation n'a pu être établie entre le nombre de mutations dans les régions HVR2, CD81-1 et CD81-2 et la réponse au traitement à 72 semaines, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse de départ qui stipulait que l'accumulation de mutations dans ces régions pourrait moduler négativement l'interaction de E2 avec son ligand de surface et ainsi favoriser l'atteinte d'une réponse virologique soutenue.

De plus, l'analyse de séquences en acides aminés du gène E2 a permis d'identifier une région très conservée de 7 acides aminés localisée entre les codons 483-489 de la région CD81-1. En se référant au modèle théorique proposé par Yagnik *et al.* (2000), les résidus aminés 480-493 sont fortement exposés à la surface de E2 et constituent en grande partie le domaine de 17 acides aminés possiblement impliqué dans la fusion virale (codons 476-494). De surcroît, la séquence peptidique PDQRPYCWHYPP_{480-493a.a.} est très conservée entre les différents sous-types du VHC, ce qui est normalement le cas pour une région protéique impliquée dans une ou plusieurs interactions avec un ligand (Flint *et al.* 1999). Il a été proposé que le motif WHY_{487-489a.a.} soit impliqué dans l'association hétérodimérique de E1 et E2, complexe fonctionnel à la surface des particules virales du VHC, de par la présence d'acides aminés chargés négativement et fortement conservés (Yagnik *et al.* 2000; Yi *et al.*

1997). Il est possible que le virus exerce des pressions négatives au niveau de cette région afin de préserver la formation d'hétérodimères de surface conférant aux virions leur pouvoir infectieux. Une seconde région très conservée est perçue entre les résidus aminés 539-551 de la région CD81-2 chez les isolats VHC-1a et VHC-1b. Il a été rapporté que les résidus aminés en positions 544-551 de la glycoprotéine d'enveloppe 2 sont très conservés et exposés à la surface du virus, ce qui est en accord avec l'hypothèse que ces acides aminés hydrophiles interagissent possiblement avec un récepteur de surface (Flint *et al.* 1999; Yagnik *et al.* 2000). En somme, la variabilité des régions de la glycoprotéine E2 avant traitement ne semble pas influencer directement la capacité du VHC à échapper aux mécanismes antiviraux induits par la bithérapie.

Protéine NS5A

L'influence des paramètres virologiques comme facteurs prédictifs indépendants de la clairance soutenue du VHC chez les patients recevant un traitement à l'IFN- α a soulevé la question à savoir si les caractéristiques intrinsèques des isolats du VHC confèrent la sensibilité ou la résistance à l'IFN- α . Alors que la fonction principale de NS5A demeure encore inconnue, le rôle potentiel de la protéine non structurale dans la détermination d'une réponse à l'IFN a été initialement présentée par Enomoto et ses collègues (1995 et 1996). Suivant l'analyse du gène NS5A de souches 1b par séquençage direct, ils ont découvert que tous les isolats VHC-1b résistants à l'IFN alpha avaient une région de 40 acides aminés identique à celle du prototype 1b (VHC-J). Ainsi, le nombre de mutations (par rapport à l'isolat VHC-J) répertorié dans la région ISDR, localisée dans la portion carboxy-terminale de NS5A, est corrélé avec la réponse ou la résistance à l'interféron alpha. Dans la présente étude, l'analyse de séquences complètes du gène NS5A chez 24 patients infectés par le génotype 1 du VHC a été réalisée dans le but d'établir une corrélation entre le nombre de substitutions et la réponse au traitement. La région ISDR s'est avérée très conservée, ce qui indique qu'aucune pression de sélection majeure ne semble s'exercer sur cette région du gène NS5A à l'étude. En contrepartie, des substitutions d'acides aminés sont fréquemment observées aux codons 2217 (génotype 1a) et 2218 (génotype 1b). Ceci suggère soit une tolérance au remplacement d'acide aminé à ces positions ou la présence de fortes pressions de sélection agissant sur ces résidus aminés (Pawlotsky *et al.* 1998b). Aucune corrélation n'a

été établie entre le nombre de substitutions nucléotidiques et aminées dans la région ISDR et la réponse au traitement. En effet, aucun des 7 patients présentant une réponse soutenue à la bithérapie ne correspondait au type mutant ISDR (≥ 4 substitutions) selon les critères d'Enomoto *et al.* (1996). Si on exclut la substitution de la thréonine pour une alanine au codon 2217 due à des variations génotypiques entre les sous-types 1a et 1b, 2 des 7 SVR ont une séquence ISDR correspondant au prototype VHC-1. Il nous a été impossible de confirmer que les isolats VHC avec une région ISDR mutée sont plus aptes à répondre au traitement à l'IFN- α puisqu'aucun des répondeurs soutenus ne possède un domaine ISDR de type mutant. Toutefois, ces données démontrent une sensibilité à l'interféron alpha chez les isolats VHC analogues au prototype ISDR (Murphy *et al.* 2002). Ce phénomène a d'ailleurs été observé chez 2 des 9 patients répondeurs infectés par le génotype 1b du VHC dans l'étude japonaise menée par Chayama *et al.* (2000). Pour ce qui est des 4 patients de l'étude, infectés par le génotype 1b du VHC, 1 patient NR présente une séquence ISDR identique au prototype 1b (type sauvage), alors que les 3 autres patients ont une seule substitution non conservée au codon 2218 (H2218R), les classant parmi le type intermédiaire qui est défini par la présence de 1-3 substitutions d'acides aminés dans la région ISDR (Enomoto *et al.* 1996).

Depuis la dernière décennie, diverses études ont évalué l'importance de la région ISDR comme facteur prédictif de la réponse à l'IFN. Alors que les travaux menés au Japon supportaient les trouvailles du groupe de recherche d'Enomoto (Chayama *et al.* 1997), la présente étude ainsi que plusieurs autres réalisées chez des patients infectés par le génotype 1a en Europe et aux États-Unis n'ont pu confirmer ces découvertes (Hofgartner *et al.* 1997; Odeberg *et al.* 1998; Zeuzem *et al.* 1997). Les séquences du prototype ISDR des génotypes 1a et 1b (VHC-1 et VHC-J, respectivement) diffèrent seulement aux codons 2217, 2218 et 2225. Étant donné que le type mutant ISDR a été initialement défini par Enomoto et ses collègues (1995), la discordance entre les résultats publiés sur le plan international impliquant des patients infectés par les génotypes 1a et 1b ne peut être uniquement attribuable aux génotypes du VHC (Murphy *et al.* 2002). Certains ont fait allusion aux fortes doses d'IFN administrées aux patients Japonais en comparaison à celles prescrites aux patients Européens afin d'expliquer ces divergences, alors qu'une étude menée aux États-Unis avec des doses comparables d'interféron a échoué dans sa tentative d'illustrer une

différence dans la séquence aminée de la région ISDR entre les répondeurs soutenus et non répondeurs (Murphy *et al.* 2002). Il est possible qu'un facteur de l'hôte précis chez les patients Japonais, n'ayant pas encore été identifié, soit à l'origine de ces dissimilitudes entre les résultats.

De par son interaction avec la protéine kinase R via une séquence localisée près de la région ISDR, la protéine NS5A consiste en un inhibiteur potentiel de PKR. La phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes eIF2 α par PKR fournit à l'hôte infecté un mécanisme antiviral clé par inhibition de la synthèse protéique et par le blocage concomitant de la réplication virale (Gale *et al.* 1998). Certaines études ont démontré que la protéine NS5A inhibe l'activité de PKR par interaction directe avec le domaine catalytique de la kinase R (Gale *et al.* 1997; Gale *et al.* 1998; Khorsi *et al.* 1998). De surcroît, des mutations de délétion ont indiqué qu'une telle interaction nécessite 26 acides aminés additionnels en carboxy-terminale de la région ISDR (Gale *et al.* 1998), connue sous l'appellation domaine de fixation à PKR (NS5A_{2209-2274a.a.}). La présence de mutations dans le domaine de fixation à PKR, incluant ISDR, résulte en la dimérisation altérée de PKR et donc, l'inhibition de la phosphorylation du facteur eIF2- α . Sarrazin *et al.* (2000) ont démontré une différence significative entre la médiane du nombre global de mutations dans le domaine de fixation à PKR par comparaison de patients infectés par le génotype 1a du VHC présentant une réponse virologique soutenue, partielle ou un échec au traitement. Cependant, nos résultats ne sont pas en accord avec cette découverte, comme ce fut le cas dans les travaux de Murphy *et al.* (2002). De plus, l'étude menée par Watanabe *et al.* (2001) a démontré une plus forte association entre les mutations présentes dans la région ISDR, plutôt que dans la portion C-terminale du domaine de fixation à PKR, et la réponse à l'IFN chez des patients infectés par le VHC-1b.

Afin d'établir l'importance de mutations à l'extérieur des régions ISDR/domaine de fixation à PKR de la protéine NS5A, l'analyse par séquençage du gène complet NS5A a été réalisée chez des isolats VHC-1a et VHC-1b. Dans les deux cas, il a été rapporté qu'une accumulation de mutations dans la région hypervariable 3 (NS5A_{2356-2379a.a.}) de la protéine non structurale 5A serait associée à l'obtention d'une réponse virologique prolongée à l'IFN- α (Duverlie *et al.* 1998; Nousbaum *et al.* 2000). Dans cette optique, nous avons investigué la région de 22 acides aminés en carboxy-terminale de NS5A, mais sans toutefois avoir pu

établir une corrélation entre la médiane du nombre de mutations dans la région V3 et la réponse au traitement. L'analyse des séquences du gène NS5A chez les 24 isolats du VHC-1a et VHC-1b a démontré une région hautement variable, supportant ainsi l'hypothèse que ce domaine a une capacité supérieure à accumuler des mutations (Inchauspe *et al.* 1991; Nousbaum *et al.* 2000).

Sérine protéase NS3

Le virus de l'hépatite C présente un degré d'hétérogénéité génétique substantiel, mais la diversité n'est toutefois pas distribuée uniformément dans tout le génome. L'étude de séquences entières du génome viral a permis de classer le domaine NS3 parmi l'une des régions les moins variables du VHC (Farci et Purcell, 2000). Puisque la protéase apparaît comme une cible potentielle au développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques du VHC, de par son rôle essentiel dans le clivage des protéines non structurales lors de la réplication virale *in vivo*, le but de cette étude était d'évaluer l'hétérogénéité génétique du domaine sérine protéase de NS3 en absence de pressions antivirales. L'existence au préalable de polymorphismes dans les isolats du VHC pourrait favoriser l'émergence et la dominance de certains variants résistants sous pression thérapeutique. Notre étude s'est concentrée sur le génotype 1 du VHC, reconnu pour ses faibles taux de réponse à la bithérapie combinant l'interféron alpha pégylé et la ribavirine. Une corrélation significative a été observée en prétraitement entre la médiane du nombre total de mutations en nucléotides et l'absence de réponse au traitement antiviral. En effet, l'étude de séquences complètes en nucléotides de la sérine protéase NS3 a démontré un nombre de substitutions globales substantiellement plus important auprès des patients en échec thérapeutique que chez les répondeurs soutenus seuls ou combinés aux répondeurs partiels. Ceci va à l'encontre de notre hypothèse de départ qui stipulait qu'en absence de traitement antiviral agissant sur la protéine NS3, un nombre plus important de mutations serait attendu dans cette région conservée et indispensable du VHC chez les répondeurs soutenus. Toutefois, aucune différence significative n'a été perçue entre les 3 groupes de patients investigués en ce qui a trait aux substitutions globales en acides aminés, mutations non synonymes et non conservées, respectivement. La proportion de substitutions globales en nucléotides et en acides aminés est nettement supérieure à la proportion de substitutions non synonymes,

suggérant que les mutations au sein de la protéase NS3 sont le produit de variations génétiques aléatoires plutôt que de pressions de sélection positive (Vallet *et al.* 2005). Ceci est en accord avec l'étude de Salemi et Vandamme (2002) démontrant que la protéine NS3 du VHC, ainsi que les régions non codantes en 5' et 3' du génome viral et la protéine de la capsid, sont soumises à de fortes pressions de sélection négative servant à contrer l'apparition de séquences divergentes.

Malgré le fait que la protéase NS3 est l'une des régions les plus conservées du génome viral, un degré de variabilité a été observé parmi les séquences en nucléotides (29,3% pour le VHC-1a et 19,5% pour le VHC-1b) et en acides aminés (1,7% pour le VHC-1a et 4,4% pour le VHC-1b) des 24 isolats analysés. Ces résultats sont similaires à ceux présentés dans les travaux publiés antérieurement de Holland-Staley *et al.* (2002) (en nucléotides : 30,2% pour 1a et 25,8% pour 1b; en acides aminés : 11% pour 1a et 9,9% pour 1b) et Lodrini *et al.* (2003) (en nucléotides : 4,45% pour 1a et 6,47% pour 1b; en acides aminés : 4% pour 1a et 3,5% pour 1b). Dans cette présente étude, l'évolution des isolats NS3 après traitement n'a pas été investiguée. Toutefois, la bithérapie combinant l'IFN- α pégylé et la ribavirine n'induit pas de pressions sélectives directes sur NS3, contrairement aux inhibiteurs sélectifs de la protéase (Trozzi *et al.* 2003).

Parmi tous les variants analysés, les substitutions conservées sont les plus fréquentes. Certaines substitutions pourraient potentiellement altérer la structure tridimensionnelle de la protéase NS3 de par leur proximité aux sites actifs de l'enzyme ou par le changement de charge des acides aminés. Cependant, la conservation relative de NS3 découle probablement de contraintes fonctionnelles exercées sur la protéase (Vallet *et al.* 2005). L'intégrité fonctionnelle et structurale de la protéine NS3 est requise dans la maturation post-traductionnelle de la polyprotéine du VHC. Quoique les protéines NS3 et NS4A soient requises *in vivo* dans le clivage de la polyprotéine, des interactions altérées entre celles-ci sont bien tolérées (Filocamo *et al.* 1999). Kim *et al.* (1996), ainsi que Yan *et al.* (1998), ont rapporté que le domaine amino-terminal de NS3 est très flexible puisque la fixation du cofacteur NS4A au niveau des 28 résidus aminés en N-terminal induit des réarrangements afin d'assurer une conformation adéquate du site catalytique. La présence de polymorphismes au sein des sites d'interaction de NS3-NS4A était un élément intéressant à investiguer puisque le complexe interfère avec le facteur 3 de régulation de l'interféron

(IRF-3), une molécule cellulaire antivirale clé, en inhibant son activation par phosphorylation (Foy *et al.* 2003). Aucune différence significative n'a été observée entre le type de résidus substitués au site de fixation de NS4A, mais également au niveau des sites actifs de l'enzyme et la réponse au traitement. Toutefois, la substitution S7A est présente chez les 4 patients infectés par le VHC-1b. Le faible nombre d'isolats 1b et l'absence de répondeurs soutenus infectés par ce sous-type ne permettent pas d'établir une corrélation entre la présence d'une telle substitution non conservée en position 7 du sous-type 1b et la réponse au traitement. Les polymorphismes observés à l'extérieur des résidus impliqués dans l'activité protéase de NS3 ou dans la liaison de substrats pourraient possiblement résulter en des substitutions aléatoires contribuant à la résistance clinique du VHC à la bithérapie antivirales. L'analyse ultérieure de quasi-espèces NS3 provenant d'un plus grand nombre de patients sera requise afin d'évaluer l'importance du nombre et du type de substitutions retrouvées dans le domaine sérine protéase NS3 et la survenue d'une réponse thérapeutique prolongée à la bithérapie combinant l'interféron alpha pégylé et la ribavirine.

Conclusion

Dans la présente étude, nous avons investigué différents patrons de mutations au sein de régions ciblées des gènes E2, NS5A et NS3 du VHC et avons évalué leur possible influence sur l'efficacité de la bithérapie combinant l'interféron α -2b pégylé et la ribavirine. En bref, les facteurs de l'hôte tels que le jeune âge, le sexe féminin et le faible grade histologique sont associés à l'obtention d'une meilleure réponse à la thérapie antivirale, bien que les résultats obtenus soient à la limite du seuil de signification. Ainsi, seul le statut thérapeutique est corrélé de façon significative à la survenue d'une réponse virologique soutenue. Le nombre total de substitutions présentes dans les régions étudiées des gènes E2 et NS5A n'a pu permettre de distinguer les différents groupes de réponse des patients à la bithérapie antivirale. Subséquemment à l'analyse des quasi-espèces HVR1, nous avons observé une tendance chez les patients en échec thérapeutique à présenter une complexité et diversité génétique plus importantes par comparaison aux répondeurs soutenus, mais cette différence est toutefois non significative. Les analyses mutationnelles du gène NS3 ont démontré un plus grand nombre de substitutions globales en nucléotides chez les patients non répondeurs, quoique la majorité de celles-ci soient conservées. La présence substantielle de polymorphismes dans la sérine protéase NS3 d'isolats du VHC-1a et VHC-1b suggère que, malgré les contraintes fonctionnelles et structurales exercées sur la protéase, cette enzyme est suffisamment flexible pour tolérer des substitutions nucléotidiques et aminées.

Malgré l'augmentation des taux de réponse à long terme au traitement, les patients infectés par les génotypes 1a ou 1b restent ceux dont les chances d'éradiquer l'infection par le VHC sont les plus limitées. Globalement, plusieurs fonctions du génome et/ou des protéines virales et leurs interactions avec diverses fonctions des cellules de l'hôte sont probablement impliquées dans la résistance du VHC aux mécanismes antiviraux de l'interféron alpha au sein de cellules infectées. L'analyse subséquente par séquençage des gènes NS5A, E2, NS3 et des quasi-espèces HVR1, à partir d'une plus grande cohorte de patients, permettra d'affiner la prédiction de la réponse virologique prolongée à la bithérapie antivirale.

Bibliographie

Anonymous (1999) Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *Journal of viral hepatitis* 6:35-47.

Anonymous (1997) Hepatitis C: global prevalence. *Weekly epidemiological record* 72:341-344.

Anonymous (2000) Hepatitis C: global prevalence. *Weekly epidemiological record* 75:17-28.

Alexopoulou, L. *et al.* (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.

Alfonso, V. *et al.* (2004) Evolutionary study of HVR1 of E2 in chronic hepatitis C virus infection. *J. Gen. Virol.* 85:39-46.

Alter, H. (1999) Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *Am.J.Med.* 107:16S-20S.

Alter, H. J. *et al.* (1989) Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N.Engl.J.Med.* 321:1494-1500.

Alter, M. J. *et al.* (1990) Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 264:2231-2235.

Alter, M. J. *et al.* (1999) The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N.Engl.J.Med.* 341:556-562.

Andria, M. L. *et al.* (1991) Genomic organization and chromosomal localization of the TAPA-1 gene. *J.Immunol.* 147:1030-1036.

Arenas, J. I. *et al.* (2004) Hepatitis C virus quasi-species dynamics predict progression of fibrosis after liver transplantation. *J.Infect.Dis.* 189:2037-2046.

Association canadienne pour l'étude du foie. Conférence consensus sur la prise en charge des hépatites virales, lignes directrices recommandées à l'intention des médecins. (2000) [http://www.phac-aspc.gc.ca/hepc/hepatite_c/pdf/soinInfo/virus.html].

Association canadienne pour l'étude du foie. Prise en charge des hépatites virales, compte rendu de la conférence consensus 2003/2004. (2004) p.12. [<http://www.hepatology.ca/cm/FileLib/FinalFrenchJune2.pdf>].

Balachandran, S. *et al.* (1998) Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J.* 17:6888-6902.

Barbato, G. *et al.* (1999) The solution structure of the N-terminal proteinase domain of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protein provides new insights into its activation and catalytic mechanism. *J.Mol.Biol.* 289:371-384.

Barrera, J. M. *et al.* (1995) Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 21:639-644.

Bartosch, B. *et al.* (2005) 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.* 79:8217-8229.

Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15:12-22.

Bottin des services du LSPQ. (2003) p. 15.
[www.inspq.qc.ca/pdf/publications/221_BottinDesServicesLSPQ2003.pdf].

Brass, V. *et al.* (2002) An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J.Biol.Chem.* 277:8130-8139.

Busch, M. P. *et al.* (1994) Reinstatement of donors who test false-positive in second-generation hepatitis C virus enzyme immunoassay should await availability of licensed third-generation tests. *Transfusion* 34:278.

Callens, N. *et al.* (2005) Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J.Virol.* 79:15331-15341.

Cao, Z., Henzel, W. J., and Gao, X. (1996) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271:1128-1131.

Carroll, S. S. *et al.* (1996) Cleavage of oligoribonucleotides by the 2',5'-oligoadenylate-dependent ribonuclease L. *J.Biol.Chem.* 271:4988-4992.

Chambers, T. J. *et al.* (2005) Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J.Virol.* 79:3071-3083.

Chayama, K. *et al.* (1997) Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 25:745-749.

Chayama, K. *et al.* (2000) Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 32:1138-1144.

Chen, S. and Wang, Y. M. (2005) Multigene tracking of quasispecies in viral persistence and clearance of hepatitis C virus. *World J.Gastroenterol.* 11:2874-2884.

- Choo, Q. L. *et al.* (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.
- Choo, Q. L. *et al.* (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:2451-2455.
- Cocquerel, L. *et al.* (1999) The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J.Virol.* 73:2641-2649.
- Conry-Cantilena, C. *et al.* (1996) Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N.Engl.J.Med.* 334:1691-1696.
- Cormier, E. G. *et al.* (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:7270-7274.
- Cranston, L. (2000) Un meilleur système d'approvisionnement en sang pour les Canadiennes et les Canadiens. *Revue canadienne de santé publique* 91:S43.
- Davis, G. L. *et al.* (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N.Engl.J.Med.* 339:1493-1499.
- Davis, G. L. (1999) Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am.J.Med.* 107:21S-26S.
- De Francesco R., Pessi A., and Steinkühler C. (1998) The hepatitis C virus NS3 proteinase: structure and function of a zinc-containing serine proteinase. *Antiviral Therapy* 3 (supplement 3):99-109.
- Di Bisceglie, A. M. *et al.* (1991) Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 14:969-974.
- Diaz, M. O., Bohlander, S., and Allen, G. (1996) Nomenclature of the human interferon genes. *J.Interferon Cytokine Res.* 16:179-180.
- Dimitrova, M. *et al.* (2003) Protein-protein interactions between hepatitis C virus non-structural proteins. *J.Virol.* 77:5401-5414.
- Drummer, H. E., Wilson, K. A., and Pountourios, P. (2002) Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J.Virol.* 76:11143-11147.
- Dubuisson, J. *et al.* (1994) Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J.Virol.* 68:6147-6160.
- Duverlie, G. *et al.* (1998) Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. *J.Gen.Virol.* 79 (Pt 6):1373-1381.

- Eckart, M. R. *et al.* (1993) The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 192:399-406.
- Egger, D. *et al.* (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J.Virol.* 76:5974-5984.
- Enomoto, N. *et al.* (1995) Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J.Clin.Invest* 96:224-230.
- Enomoto, N. *et al.* (1996) Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N.Engl.J.Med.* 334:77-81.
- Farci, P. *et al.* (1991) A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N.Engl.J.Med.* 325:98-104.
- Farci, P. *et al.* (1994) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:7792-7796.
- Farci, P. *et al.* (1996) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:15394-15399.
- Farci, P. *et al.* (2000) The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288:339-344.
- 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.
- Farci, P. and Purcell, RH. (2000) Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin. Liver Dis.* 20:103-126.
- Ferreon, J. C. *et al.* (2005) Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *J.Biol.Chem.* 280:20483-20492.
- Filocamo, G. *et al.* (1999) Selection of functional variants of the NS3-NS4A protease of hepatitis C virus by using chimeric sindbis viruses. *J.Virol.* 73:561-575.
- Fitzgerald, K. A. *et al.* (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
- Flint, M. *et al.* (1999) Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J.Virol.* 73:6782-6790.
- Foy, E. *et al.* (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300:1145-1148.

- Fried, M. W. (1999) Diagnostic testing for hepatitis C: practical considerations. *Am.J.Med.* 107:31S-35S.
- Fried, M. W. *et al.* (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N.Engl.J.Med.* 347:975-982.
- Fu, X. Y. *et al.* (1992) The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:7840-7843.
- Gale, M. J., Jr. *et al.* (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230:217-227.
- Gale, M., Jr. *et al.* (1998) Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol.Cell Biol.* 18:5208-5218.
- Gallois-Montbrun, S. *et al.* (2003) Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol.Pharmacol.* 63:538-546.
- Gerlach, J. T. *et al.* (1999) Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117:933-941.
- Giovannini, M. *et al.* (1990) Maternal-infant transmission of hepatitis C virus and HIV infections: a possible interaction. *Lancet* 335:1166.
- Gonzalez-Peralta, R. P. *et al.* (1996) Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J.Med.Virol.* 49:242-247.
- Griffin, S. D. *et al.* (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535:34-38.
- He, L. F. *et al.* (1987) Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J.Infect.Dis.* 156:636-640.
- Hépatite C. Organisation mondiale de la Santé (OMS), feuille d'information numéro 164. (1997) [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/fr/>].
- Higginbottom, A. *et al.* (2000) Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J.Virol.* 74:3642-3649.
- Hijikata, M. *et al.* (1991) Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:5547-5551.
- Hijikata, M. *et al.* (1993) Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J.Virol.* 67:4665-4675.

- Hofgartner, W. T. *et al.* (1997) Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in North American patients infected with HCV genotype 1a or 1b. *J.Med.Virol.* 53:118-126.
- Hofmann, W. P. *et al.* (2003) Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J.Infect.Dis.* 187:982-987.
- Holland-Staley, C. A. *et al.* (2002) Genetic diversity and response to IFN of the NS3 protease gene from clinical strains of the hepatitis C virus. *Arch.Virol.* 147:1385-1406.
- Honda, M. *et al.* (1999) A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J.Virol.* 73:1165-1174.
- Hope, R. G. and McLauchlan, J. (2000) Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J.Gen.Virol.* 81:1913-1925.
- Hornig, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat.Immunol.* 2:835-841.
- Hovanessian, A. G. *et al.* (1988) Characterization of 69- and 100-kDa forms of 2-5A-synthetase from interferon-treated human cells. *J.Biol.Chem.* 263:4945-4949.
- Hu, Y. W. *et al.* (2005) Immunoglobulin mimicry by Hepatitis C Virus envelope protein E2. *Virology* 332:538-549.
- Hugle, T. *et al.* (2001) The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284:70-81.
- Hussy, P. *et al.* (1996) Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 224:93-104.
- Igarashi, K. *et al.* (1994) Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J.Biol.Chem.* 269:14333-14336.
- Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. (2003) Toll signaling: the TIReless quest for specificity. *Nat.Immunol.* 4:105-106.
- Inchauspe, G. *et al.* (1991) Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:10292-10296.
- Ishak, K. *et al.* (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J.Hepatol.* 22:696-699.

- Ishido, S., Fujita, T., and Hotta, H. (1998) Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 244:35-40.
- Jiang, Z. *et al.* (2004) Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:3533-3538.
- Kato, N. *et al.* (1992) Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 189:119-127.
- Kato, N. *et al.* (1994) Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J.Virol.* 68:4776-4784.
- Kato, T. *et al.* (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterol.* 125:1808-1817.
- Katze, M. G., He, Y., and Gale, M., Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat.Rev.Immunol.* 2:675-687.
- Kerr, I. M. and Brown, R. E. (1978) pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75:256-260.
- Khorsi, H. *et al.* (1997) Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209-2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in French patients. *J.Hepatol.* 27:72-77.
- Kim, D. W. *et al.* (1997) Towards defining a minimal functional domain for NTPase and RNA helicase activities of the hepatitis C virus NS3 protein. *Virus Res.* 49:17-25.
- Kim, J. L. *et al.* (1996) Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87:343-355.
- Kleinman, S., Busch, M., and Holland, P. (1992) Post-transfusion hepatitis C virus infection. *N.Engl.J.Med.* 327:1601-1602.
- Ko, Y. C. *et al.* (1992) Tattooing as a risk of hepatitis C virus infection. *J.Med.Virol.* 38:288-291.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J.Virol.* 70:3363-3371.
- Kolykhalov, A. A. *et al.* (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J.Virol.* 74:2046-2051.

- Komatsu, H. *et al.* (1997) Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon therapy in young patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *J.Med.Virol.* 53:361-365.
- Kotenko, S. V. *et al.* (1995) Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J.Biol.Chem.* 270:20915-20921.
- Koziel, M. J. *et al.* (1993) Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J.Virol.* 67:7522-7532.
- Kronenberger, B. *et al.* (2001) Interferon alfa down-regulates CD81 in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 33:1518-1526.
- Kumar, A. *et al.* (1994) Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:6288-6292.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief.Bioinform.* 5:150-163.
- Kunkel, M. *et al.* (2001) Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J.Virol.* 75:2119-2129.
- Lam, N. P. *et al.* (1997) Effect of obesity on pharmacokinetics and biologic effect of interferon-alpha in hepatitis C. *Dig.Dis.Sci.* 42:178-185.
- Lau, J. F., Parisien, J. P., and Horvath, C. M. (2000) Interferon regulatory factor subcellular localization is determined by a bipartite nuclear localization signal in the DNA-binding domain and interaction with cytoplasmic retention factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:7278-7283.
- Lavillette, D. *et al.* (2005) Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 41:265-274.
- Layden-Almer, J. E. *et al.* (2005) Hepatitis C virus genotype 1a NS5A pretreatment sequence variation and viral kinetics in African American and white patients. *J.Infect.Dis.* 192:1078-1087.
- Lerat, H. *et al.* (1998) In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 91:3841-3849.
- Li, K. *et al.* (2005) Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:2992-2997.
- Lin, H. H. *et al.* (1994) Possible role of high-titer maternal viremia in perinatal transmission of hepatitis C virus. *J.Infect.Dis.* 169:638-641.

- Lindsay, K. L. *et al.* (2001) A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 34:395-403.
- Lo, S. Y. *et al.* (1994) Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology* 199:124-131.
- Lo, S. Y. *et al.* (1995) Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 213:455-461.
- Lodrini, S. *et al.* (2003) Sequence analysis of NS3 protease gene in clinical strains of hepatitis C virus. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents* 17:198-204.
- Lopez-Labrador, F. X. *et al.* (1999) Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection [correction of interferon]. *Hepatology* 29:897-903.
- Manns, M. P. *et al.* (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358:958-965.
- Marie, I., Durbin, J. E., and Levy, D. E. (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 17:6660-6669.
- Martell, M. *et al.* (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.
- McHutchison, J. (1999) Hepatitis C therapy in treatment-naive patients. *Am.J.Med.* 107:56S-61S.
- McHutchison, J. G. *et al.* (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N.Engl.J.Med.* 339:1485-1492.
- McHutchison J.G. *et al.* (1999) The impact of race on response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 30:302A.
- McLauchlan, J. (2000) Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J.Viral Hepat.* 7:2-14.
- Mirny, L. A. and Shakhnovich, E. I. (1999) Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. *J.Mol.Biol.* 291:177-196.

- Moradpour, D. *et al.* (2003) Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res.* 60:103-109.
- Morales, T. G. *et al.* (1995) Liver histology in anti-HCV-positive persons with normal or minimally elevated aminotransferases. *J.Clin.Gastroenterol.* 21:301-305.
- Murphy, M. D. *et al.* (2002) Analysis of sequence configurations of the ISDR, PKR-binding domain, and V3 region as predictors of response to induction interferon-alpha and ribavirin therapy in chronic hepatitis C infection. *Dig.Dis.Sci.* 47:1195-1205.
- Neumann, A. U. *et al.* (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282:103-107.
- Neumann, A. U. *et al.* (2002) The second phase HCV decline slope is the best predictor of sustained viral response during treatment of chronic HCV genotype 1 patients viral response during treatment of chronic HCV genotype 1 patients with peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology* 36:357A.
- National institute of health consensus development conference statement. Management of hepatitis C (2002) [http://www.hemophilia.ca/pdf_bilingue/NIHHePC_Consen.pdf].
- Nousbaum, J. *et al.* (2000) Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J.Virol.* 74:9028-9038.
- Novick, D., Cohen, B., and Rubinstein, M. (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77:391-400.
- Odeberg, J. *et al.* (1998) Variation in the hepatitis C virus NS5a region in relation to hypervariable region 1 heterogeneity during interferon treatment. *J.Med.Virol.* 56:33-38.
- Ohto, H. *et al.* (1994) Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N.Engl.J.Med.* 330:744-750.
- Okada, S. *et al.* (1992) 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* 16:619-624.
- Op, De Beeck *et al.* (2000) The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J.Biol.Chem.* 275:31428-31437.
- Oshiumi, H. *et al.* (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat.Immunol.* 4:161-167.
- Otsuka, M. *et al.* (2005) Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* 41:1004-1012.

- Patel, R. C. *et al.* (1995) The interferon-inducible double-stranded RNA-activated protein kinase self-associates in vitro and in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:8283-8287.
- Pavlovic, D. *et al.* (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6104-6108.
- Pawlotsky, J. M. *et al.* (1995) Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J.Infect.Dis.* 171:1607-1610.
- Pawlotsky, J. M. *et al.* (1996) Factors affecting treatment responses to interferon-alpha in chronic hepatitis C. *J.Infect.Dis.* 174:1-7.
- Pawlotsky, J. M. *et al.* (1998a) Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J.Virol.* 72:2795-2805.
- Pawlotsky, J. M. *et al.* (1998b) Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J.Med.Virol.* 54:256-264.
- Pawlotsky, J. M. *et al.* (1999) Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J.Virol.* 73:6490-6499.
- Penin, F. *et al.* (2001) 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.* 75:5703-5710.
- Pileri, P. *et al.* (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
- Pineiro-Carrero, V. M. and Pineiro, E. O. (2004) Liver. *Pediatrics* 113:1097-1106.
- Polyak, S. J. *et al.* (1997) Assessment of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by gel shift analysis: correlation with response to interferon therapy. *J.Infect.Dis.* 175:1101-1107.
- Polyak, S. J. *et al.* (1998) Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J.Virol.* 72:4288-4296.
- Poynard, T. *et al.* (1998) Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352:1426-1432.
- Puig-Basagoiti, F. *et al.* (2001) Influence of the genetic heterogeneity of the ISDR and PePHD regions of hepatitis C virus on the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *J.Med.Virol.* 65:35-44.

- Puig-Basagoiti, F. *et al.* (2005) Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and non-responder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J.Gen.Virol.* 86:1067-1075.
- Pybus, O. G. *et al.* (2001) The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 292:2323-2325.
- Reich, N. *et al.* (1987) Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:6394-6398.
- Robertson, B. *et al.* (1998) Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch.Virol.* 143:2493-2503.
- Roccasecca, R. *et al.* (2003) Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J.Virol.* 77:1856-1867.
- Roque Afonso, A. M. *et al.* (1999) Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J.Virol.* 73:9213-9221.
- Roudot-Thoraval, F. (1998) Hepatitis C in a prison environment: is screening necessary? *Gastroenterol.Clin.Biol.* 22:41-42.
- Sakai, A. *et al.* (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:11646-11651.
- Salemi, M. and Vandamme, A. M. (2002) Hepatitis C virus evolutionary patterns studied through analysis of full-genome sequences. *J.Mol.Evol.* 54:62-70.
- Samuel, C. E. (1979) Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase processing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76:600-604.
- Sanchez-Quijano, A. *et al.* (1990) Hepatitis C virus infection in sexually promiscuous groups. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 9:610-612.
- Sandres, K. *et al.* (2000) Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J.Virol.* 74:661-668.
- Sandres-Sauné K. *et al.* (2003) Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *Journal of virological methods* 109:187-193.
- Sarrazin, C. *et al.* (2000) Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J.Infect.Dis.* 181:432-441.

- Sarrazin, C. *et al.* (2001) Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 289:150-163.
- Sarrazin, C. *et al.* (2002) Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J.Virol.* 76:11079-11090.
- Sato, M. *et al.* (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13:539-548.
- Sato, S. *et al.* (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J.Immunol.* 171:4304-4310.
- Scarselli, E. *et al.* (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21:5017-5025.
- Schiff, E. R. (1999) The alcoholic patient with hepatitis C virus infection. *Am.J.Med.* 107:95S-99S.
- Seeff, L.B. (1999) Natural history of hepatitis C. *Am.J.Med.* 107:10S-15S.
- Sharma, S. *et al.* (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300:1148-1151.
- Shindo, M. *et al.* (1996) The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* 24:1018-1023.
- Shiratori, Y. *et al.* (1997) Quantitative assays for hepatitis C virus in serum as predictors of the long-term response to interferon. *J.Hepatol.* 27:437-444.
- Sidwell, R. W. *et al.* (1972) Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177:705-706.
- Simmonds, P. (1997) Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. *Gut* 40:291-293.
- Simmonds, P. *et al.* (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-973.
- Squadrito, G. *et al.* (1997) Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology* 113:567-572.
- Surveillance resserrée de l'hépatite C. Programme de prévention, de soutien et de recherche pour l'hépatite C, Santé Canada. (2003) [http://www.phac-aspc.gc.ca/hepc/hepatite_c/pdf/hepcInteriminaire/i_problematique.html].

- Taylor, D. R. *et al.* (1999) Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285:107-110.
- Thorpe, L. E. *et al.* (2002) Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *Am.J.Epidemiol.* 155:645-653.
- Troesch, M. *et al.* (2006) Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352:357-367.
- Toyoda, H. *et al.* (1998) Quasispecies nature of hepatitis C virus (HCV) in patients with chronic hepatitis C with mixed HCV subtypes. *J.Med.Virol.* 54:80-85.
- Trozzi, C. *et al.* (2003) In vitro selection and characterization of hepatitis C virus serine protease variants resistant to an active-site peptide inhibitor. *J.Virol.* 77:3669-3679.
- Tsubota, A. *et al.* (1994) Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 19:1088-1094.
- Tsubota, A. *et al.* (1997) Time course of histological changes in patients with a sustained biochemical and virological response to interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J.Hepatol.* 27:49-55.
- Tsukiyama-Kohara, K. *et al.* (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J.Virol.* 66:1476-1483.
- Vallet, S. *et al.* (2005) Genetic heterogeneity of the NS3 protease gene in hepatitis C virus genotype 1 from untreated infected patients. *J.Med.Virol.* 75:528-537.
- van Doorn, L. J. *et al.* (1995) Sequence evolution of the hypervariable region in the putative envelope region E2/NS1 of hepatitis C virus is correlated with specific humoral immune responses. *J.Virol.* 69:773-778.
- Wakita, T. *et al.* (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11: 791-796.
- Watanabe, H. *et al.* (2001) Number and position of mutations in the interferon (IFN) sensitivity-determining region of the gene for nonstructural protein 5A correlate with IFN efficacy in hepatitis C virus genotype 1b infection. *J.Infect.Dis.* 183:1195-1203.
- Weiner, A. J. *et al.* (1992) Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:3468-3472.
- Weiner, A. *et al.* (1995) Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:2755-2759.

- Wesche, H. *et al.* (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7:837-847.
- Williams, B. R. and Sen, G. C. (2003) Immunology. A viral on/off switch for interferon. *Science* 300:1100-1101.
- Witherell, G. W. and Beineke, P. (2001) Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J.Med.Virol.* 63:8-16.
- Witkowski, J. T. *et al.* (1972) Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-*-D*-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *J.Med.Chem.* 15:1150-1154.
- Wolk, B. *et al.* (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J.Virol.* 74:2293-2304.
- Xu, Z. *et al.* (2001) Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* 20:3840-3848.
- Xu, Z. *et al.* (2003) Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J.Virol.* 77:1578-1583.
- Yagnik, A. T. *et al.* (2000) A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins-Structure Function and Genetics* 40:355-366.
- Yan, Y. *et al.* (1998) Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.* 7:837-847.
- Yeow, W. S. *et al.* (2000) Reconstitution of virus-mediated expression of interferon alpha genes in human fibroblast cells by ectopic interferon regulatory factor-7. *J.Biol.Chem.* 275:6313-6320.
- Yi, M. *et al.* (1997) Delineation of regions important for heteromeric association of hepatitis C virus E1 and E2. *Virology* 231:119-129.
- Yoneyama, M. *et al.* (1998) Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J.* 17:1087-1095.
- Zeuzem, S., Lee, J. H., and Roth, W. K. (1997) Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 25:740-744.
- Zeuzem, S. *et al.* (2000) Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N.Engl.J.Med.* 343:1666-1672.
- Zhang, J. *et al.* (2004) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J.Virol.* 78:1448-1455.

Zhong, J. *et al.* (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. PNAS 102:9294-9099.

Zhou, A., Hassel, B. A., and Silverman, R. H. (1993) Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. Cell 72:753-765.

Zou, S., Tepper, M., and Giulivi, A. (2000) Situation actuelle de l'hépatite C au Canada. Revue canadienne de santé publique 91:S10.

Zou, S., Tepper, M., and Giulivi, A. (2001) L'hépatite virale et des nouveaux agents pathogènes transmissibles par le sang au Canada. Relevé des maladies transmissibles au Canada 27:S3.

Zuckerman, E. *et al.* (2003) Antiviral treatment down-regulates peripheral B-cell CD81 expression and CD5 expansion in chronic hepatitis C virus infection. J.Virol. 77:10432-10436.

Annexes



**Réseau sida
et maladies
infectieuses**
du Fonds de la recherche
en santé du Québec

Journée des étudiants, stagiaires et résidents

Vendredi 20 février 2004

Shératon Laval

Notes**ÉTUDE DES POLYMORPHISMES GÉNÉTIQUES RELIÉS À LA RÉSISTANCE DU VIRUS DE L'HÉPATITE C AU TRAITEMENT**

Marie-Jeanne Bertrand, Claudine Matte et Michel Roger, Hôpital Notre-Dame

Le développement récent d'un régime thérapeutique puissant pour le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C, soit la combinaison interféron-alpha pégylé et Ribavirine, a permis d'accroître l'efficacité de la thérapie antivirale, mais près de la moitié des patients ne répondent pas. Plusieurs études ont révélé l'implication de facteurs génétiques viraux prédictifs de la réponse au traitement. En effet, l'échec thérapeutique est associé aux génotypes 1 et 4 du VHC et à une charge virale pré-thérapeutique élevée. L'émergence continue de quasi-espèces, définie par la région HVR1 de E2, pourrait être associée à la résistance au traitement. Cependant, l'accroissement du nombre de mutations dans les régions ISDR et V3 du gène NS5A et HVR2 de la glycoprotéine E2 semble corrélé à une réponse virologique soutenue. L'étude des segments génomiques ISDR, V3 et HVR2 est réalisée par séquençage direct à partir d'échantillons de plasma provenant de 40 patients infectés par le génotype 1 du VHC et naïfs au traitement antiviral. Nous allons procéder prochainement au développement de la méthodologie d'analyse des quasi-espèces par clonage de la région HVR1. Jusqu'à présent, les régions ISDR, V3 et HVR2 ont été analysées chez 10 patients à 0 et 12 semaines de traitement. Nous avons répertorié divers polymorphismes dans ces régions, dont plusieurs sont retrouvés chez la majorité des prélèvements à l'étude. De plus, certaines de ces mutations retrouvées dans la séquence génomique du VHC induisent des changements d'acides aminés, ce qui pourrait favoriser une réponse soutenue au traitement antiviral.

