



Université de Montréal

**Étude des réponses humorales chez la femme enceinte infectée par  
le virus de l'hépatite C : cytotoxicité dépendante des anticorps  
(ADCC) et réponses neutralisantes**

par Kimberly Ann Milton McSween

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. Sc.)  
en microbiologie et immunologie

Mai 2017

© Kimberly Ann Milton McSween, 2017

Ce mémoire intitulé :

**Étude des réponses humorales chez la femme enceinte infectée par  
le virus de l'hépatite C : cytotoxicité dépendante des anticorps  
(ADCC) et réponses neutralisantes**

présenté par Kimberly Ann Milton McSween

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Lemay

*Président-rapporteur*

Dr Hugo Soudeyns

*Directeur de recherche*

Dr Alain Lamarre

*Membre du Jury*

## Résumé

Infectant près de 185 millions d'individus dans le monde, le virus de l'hépatite C (VHC) est une cause importante d'hépatite virale chronique, qui mène éventuellement à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire. Dans les pays développés, la principale cause d'infection chez les enfants est la transmission de la mère à l'enfant (TME) durant la grossesse ou lors de l'accouchement et qui se produit dans <10% des cas. L'évolution de l'hépatite C lors de la grossesse est mal comprise, on observe une augmentation de la charge virale au 3<sup>e</sup> trimestre de la grossesse qui redescend suite à l'accouchement. Cette diminution s'accompagne d'une augmentation significative des marqueurs sériques d'inflammation du foie et d'une détérioration de la fonction hépatique chez une proportion importante des femmes infectées.

Le développement de modèles de culture *in vitro* a permis de reconnaître l'implication de la réponse humorale neutralisante anti-VHC dans la progression clinique de l'hépatite C. Par contre, l'impact des anticorps (AC) neutralisants et non-neutralisants dans la pathologie de l'hépatite C en grossesse reste un sujet peu étudié.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la pression sélective exercée par les réponses neutralisantes anti-VHC menait à une diversification de la quasiespèce du VHC chez les femmes mono-infectées ou co-infectées par le VIH. Cette diversification est associée à une fréquence réduite de TME et à des niveaux d'inflammation hépatique plus faible chez les patientes mono-infectées uniquement. Chez les patientes co-infectées, la diversification de la quasiespèce et la présence de réponses neutralisantes ne suffisent pas à diminuer les risques de TME.

Nous proposons également un rôle pour les anticorps (AC) non-neutralisants dans l'exacerbation de l'inflammation hépatique chez les femmes ne présentant pas de réponses neutralisantes anti-VHC. Cette inflammation pourrait être reliée à la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), dont le rôle dans le contrôle de la virémie reste à déterminer. Les différentes avenues entreprises afin d'élaborer un essai permettant de quantifier la réponse ADCC spécifique au VHC seront exposées dans cet ouvrage.

Cette étude a ainsi contribué à mieux comprendre le rôle des réponses humorales neutralisantes et l'implication probable de l'ADCC dans la pathogénèse de l'hépatite C en grossesse.

**Mots-clés :** VHC, ADCC, réponses humorales, neutralisation, grossesse

## **Abstract**

Almost 185 million people worldwide are infected with hepatitis C virus (HCV) and are at risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In developed countries, the major cause of infection in children is mother-to-child transmission (MTCT), which occurs in <10% of cases during pregnancy or at delivery. For reasons that remain poorly understood, HCV viral load increases in the third trimester of gestation and decreases following delivery. This situation is often followed by elevated serum markers of liver inflammation and by an exacerbation of hepatic pathology in an important fraction of infected women.

The development of *in vitro* culture models enabled the recognition of the implication of humoral immune responses in the clinical evolution of hepatitis C. Nonetheless, the impact of neutralizing antibodies (AB) and non-neutralizing AB in the pathology of hepatitis C in pregnancy has been under-investigated.

In this study, we report evidence that the selective pressure exerted by the neutralizing responses against HCV is responsible for the diversification of HCV quasispecies in HCV mono-infected women and women co-infected with HCV and HIV. This diversification was associated with a reduced frequency of MTCT and with reduced hepatic inflammation in mono-infected patients only. In co-infected patients, quasispecies diversification and the presence of neutralizing antibodies are not sufficient to reduce the risk of MTCT.

We also propose a role for non-neutralizing AB in the exacerbation of hepatic inflammation in women without neutralizing activity against HCV. The elevated hepatic inflammation could be linked to the antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC), the role of which has yet to be defined in the control of HCV viremia. In the aim of elaborating a quantitative assay to measure ADCC specific for HCV, different approaches have been tested and will be presented in this monograph.

This study has contributed to a better understanding of the role of neutralizing humoral responses and the likely implication of ADCC in the pathogenesis of hepatitis C in pregnancy.

**Keywords :** HCV, ADCC, humoral responses, neutralization, pregnancy

## Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
1. Virologie du VHC.....	1
1.1 Structure et organisation .....	1
1.2 Cycle de réplication viral .....	2
2. Pathologie .....	6
2.1 Historique, modèles expérimentaux et traitements.....	6
2.2 Évolution naturelle de l'hépatite C .....	7
2.3 Transmission.....	8
3. Immunité.....	9
3.1 Immunité innée .....	10
3.2 Immunité adaptative.....	11
4. Co-infection avec le VIH.....	17
5. VHC et grossesse .....	18
5.1 Pathologie et immunité .....	18
5.2 Traitement.....	19
6. Hypothèse et objectifs.....	20
Matériel et méthodes.....	21
1. Culture des cellules.....	21
2. Production de vecteurs.....	21
2.1 Transformation, amplification et purification de plasmides.....	21

2.2 Vérification de l'intégrité des plasmides isolés : digestion enzymatique et séquençage.	22
2.3 Gateway : Réaction de recombinaison par la LR clonase.	22
3. Transduction de cellules eucaryotes	23
3.1 Lignées cellulaires	23
3.2 Transfection des HEK 293T pour la production de lentivirus codant pour E1E2.	24
3.3 Infection de lignées eucaryotes par des lentivirus codant pour E1E2.	24
4. Purification d'AC	24
4.1 Précipitation protéique	24
4.2 Dialyse	25
4.3 Purification d'AC sur colonne d'affinité de protéine G.	25
5. Marquage d'E1E2	25
5.1 Titrage de H53	25
5.2 Marquage intracellulaire	25
5.3 Marquage de surface	26
6. CRISPR-Cas9	26
6.1 Détermination des cibles et des séquences des ARNg.	26
6.2 Transcription <i>in vitro</i>	27
6.3 Transfection	27
6.4 Marquage de CD81	28
7. Liaison de E2 à la surface des CEM-NK <sup>R</sup> .	28
8. ADCC	29
8.1 Marquage	29
8.2 Extraction et concentration des IgG.	29
8.3 Essai ADCC	29
9. Activité neutralisante	30
9.1 Transfection des HEK 293T	30
9.2 Extraction et concentration des IgG.	30
9.3 Infection des Huh 7.5	31
9.4 Révélation	31
10. Analyse statistique	31

10.1 Profil de quasiespèce.....	31
10.2 Tests statistiques .....	32
Résultats .....	33
1. Production et titrage de l'AC primaire H53.....	33
2. Production des cellules cibles CEM-NK <sup>R</sup> exprimant E1E2 à leur surface pour l'essai d'ADCC .....	34
2.1 Infection de différentes lignées cellulaires avec des lentivirus codant pour E1E2.....	34
2.2 Développement d'une lignée CEM-NK <sup>R</sup> déficiente pour CD81 .....	37
2.3 Infection d'une lignée CEM-NK <sup>R</sup> CD81 <sup>-</sup> avec des lentivirus codant pour E1E2.....	39
2.4 Liaison d'E2 à la surface des CEM-NK <sup>R</sup> .....	41
3. Élaboration de l'essai d'ADCC .....	43
4. Essais de neutralisation.....	45
5. Analyse statistique des essais de neutralisation.....	48
5.1 Neutralisation et diversité .....	48
5.2 TME .....	49
5.3 Inflammation hépatique .....	51
5.4 Co-infection .....	52
Discussion.....	53
1. L'influence de l'ADCC sur la pathologie de l'hépatite C .....	53
1.1 Revue de la littérature : le rôle de l'ADCC dans le contrôle de l'infection par le VHC .....	54
1.2 Intégration du rôle de l'ADCC dans le contrôle de l'infection par le VHC à la présente étude.....	55
1.3 Reconsidération du rôle de l'ADCC dans le contrôle de l'infection par le VHC.....	56
2. Considérations techniques liées à l'élaboration d'un test mesurant l'activité ADCC spécifique au VHC.....	58
2.1 Système lentiviral d'expression de E1E2 .....	58
2.2 Interaction de E1E2 avec CD81.....	59
2.3 E2 soluble et essai d'ADCC .....	60
2.4 Amélioration du système de quantification de l'ADCC.....	61

3. Rôle de la réponse humorale neutralisante dans la pathologie de l'hépatite C.....	62
3.1 La réponse humorale exerce une pression sélective menant à la diversification de la quasiespèce du VHC lors de la grossesse. ....	62
3.2 La diversification de la quasiespèce contribue au contrôle de la TME .....	63
3.3 La diversification de la quasiespèce contribue au contrôle de l'inflammation hépatique .....	65
3.4 Impact de la co-infection par le VIH .....	66
3.5 Améliorations à apporter aux essais de neutralisation.....	67
Conclusion .....	68
Bibliographie.....	i
Annexes.....	xii
1. Vérification des vecteurs utilisés dans le projet sur l'ADCC .....	xii
2. Séquence de la glycoprotéine d'enveloppe E1E2.....	xiii
3. Carte génomique des vecteurs utilisés dans le projet d'ADCC .....	xiv
4. CRISPR-Cas9 : Système lentiviral créé par l'équipe du Dr Beauséjour .....	xviii
5. Profils de quasiespèce .....	xix
6. Caractéristiques cliniques et expérimentales de la cohorte.....	xxi

## **Liste des tableaux**

Tableau I. Séquence nucléotidique des ARNg .....	27
Tableau SI. Enzymes, amorces de séquençage et produits de digestion attendus pour les vecteurs utilisés dans le projet sur l'ADCC .....	xi
Tableau SII. Caractéristiques cliniques et expérimentales de la cohorte .....	xx

## Liste des figures

Figure 1. Organisation du génome et fonction des protéines du VHC .....	2
Figure 2. Mécanisme d'entrée du VHC dans un hépatocyte .....	4
Figure 3. Réplication et assemblage des particules virales.....	5
Figure 4. Contribution des réponses immunitaires dans la résolution spontanée de l'infection en phase aigüe ou dans le développement de la chronicité .....	10
Figure 5. Modèle de l'hétérodimère E1E2.....	14
Figure 6. Mécanisme de l'ADCC .....	15
Figure 7. Réactions des clones BP et LR du système Gateway .....	23
Figure 8. Titrage de l'AC primaire anti-E1E2 H53 sur des cellules HEK 293T produisant des VHCpp .....	33
Figure 9. Expression intracellulaire et de surface d'E1E2 dans les lignées cellulaires HEK 293T, Huh 7.5 et CEM-NK <sup>R</sup> .....	36
Figure 10. Efficacité du système CRISPR-Cas9 basé sur la transfection d'ARNg et de la nucléase Cas9 dans les cellules HEK 293T et CEM-NK <sup>R</sup> .....	38
Figure 11. Obtention d'une lignée CEM-NK <sup>R</sup> CD81 <sup>-</sup> et expression d'E1E2.....	40
Figure 12. Liaison d'E2 à la surface des CEM-NKR : titrage, spécificité et durée de la liaison .....	42
Figure 13. Élaboration d'un essai d'ADCC.....	44
Figure 14. Infectivité des VHCpp de références.....	45
Figure 15. Pourcentage de neutralisation aux différents trimestres de grossesse.....	47
Figure 16. Relation entre activité neutralisante, pression sélective et diversité de la quasiespèce .....	49
Figure 17. Influence de la diversité de la quasiespèce et de l'activité neutralisante sur la probabilité de TME du VHC.....	50
Figure 18. Niveaux des marqueurs d'inflammation hépatique en fonction de la diversité de la quasiespèce, de l'activité neutralisante et de la TME chez les patientes mono-infectées .....	51
Figure 19. Rôle possible de l'activité ADCC chez les femmes mono-infectées .....	54
Figure 20. Impact de l'activité neutralisante chez les femmes mono-infectées .....	62
Figure S1. Vecteurs nécessaires à la construction des particules lentivirales.....	xiii

Figure S2. Vecteurs d'intégration des particules lentivirales ..... xv  
Figure S3. Production de cellules CEM-NKR CD81- avec un système lentiviral de CRISPR-  
Cas 9..... xvii  
Figure S4. Profil de diversité de la quasiespèce des patientes mono-infectées (A, B) et co-  
infectées (C, D)..... xviii

## **Liste des abréviations**

A : NS4A

aa : acide aminé

AB : « Antibody »

AC : anticorps

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

apoE : apolipoprotéine E

ALT : alanine aminotransférase

ARNg/gRNA: ARN guide

ARNtrac : ARN transactivateur de l'ARN CRISPR

ASB : albumine sérique de bœuf

AST : aspartate aminotransférase

C : capsid

Ca : calcium

cART : thérapie antirétrovirale combinée

CD : « Cluster of Differentiation »

CEM-NK<sup>R</sup> : cellules CEM résistante à la lyse par les cellules NK

CHO : « Chinese Hamster Ovary »

CLDN1 : claudine-1

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CpG : dinucléotide cytosine-phosphate-guanine

<sup>51</sup>Cr : chrome 51

CRIPSR: « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »

DAA : antiviraux à action directe

DMEM : « Dulbecco Modified Eagle medium »

DMSO : diméthylsulfoxyde

dN : taux de mutations non-synonymes par sites potentiels

dS : taux de mutations synonymes par sites potentiels

E : enveloppe

EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique  
Fc : fraction cristallisable des immunoglobulines  
FcR $\gamma$ III : récepteur Fc $\gamma$ III  
FD : faible diversité  
FDA : « Food and Drug Administration »  
FSC : « Forward-scattered light »  
GAG: glucosaminoglycane  
gp : glycoprotéine  
Grz : granzymes  
HBS : « HEPES Buffered Saline »  
HCV : « Hepatitis C Virus »  
HD : haute diversité  
HDL : lipoprotéines de haute densité  
HEK: « Human Embryonic Kidney »  
HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
HVR : région hypervariable  
IgG : immunoglobuline G  
IL : interleukine  
ILR : intensité lumineuse relative  
IFN : interféron  
IgVR : « Intergenic Variable Region »  
ISG: gènes stimulés par l'interféron  
ISNM : indice de Shannon normalisé moyen  
JFH-1 : « Japanese Fulminant Hepatitis-1 »  
IRES : « Internal Ribosome Entry Site »  
LEL : « Long Extracellular Loop »  
LDLR : « Low Density Lipoprotein Receptor »  
MFI : moyenne de l'intensité de fluorescence  
MTCT : « Mother-to-Child-Transmission »  
NCR : région non-codante  
NK: « Natural Killer »

NS : non-structurale  
OCLN : occludine  
OR : « Odds Ratio »  
PAM: « Proto-spacer Adjacent Motif »  
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique  
PBS : « Phosphate Buffered Saline »  
PEI: Polyéthylèneimine  
PGK : phosphoglycérate kinase  
PKR : protéine kinase R  
RE: réticulum endoplasmique  
RPMI: « Roswell Park Memorial Institute media »  
SR-BI : « Scavenger Receptor B Type 1 »  
SSC : « Side-scattered light »  
SVF: Sérum de veau fœtal  
SVR : réponse virologique soutenue  
Th: T « helper » auxiliaire  
TLR : « Toll-Like Receptor »  
TME : transmission mère-enfant  
Treg: T régulateur  
VFS: virus de la forêt de Semliki  
VHC : virus de l'hépatite C  
VHCcc : VHC dérivé de culture cellulaire  
VHCpp : pseudoparticules du VHC  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
VL: vésicule lipidique  
VLDL : lipoprotéines de très faible densité

*À mes parents, qui ont fait de l'éducation de leurs filles une priorité.*

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier ceux et celles qui ont fait de mon milieu d'accueil de maîtrise, un environnement d'apprentissage, d'entraide et de développement intellectuel.

Merci Dr Soudeyns, non seulement pour l'opportunité et la confiance que vous m'avez offertes, mais aussi pour votre contribution majeure dans la qualité de l'enseignement du département de microbiologie, infectiologie et immunologie de l'Université de Montréal.

Merci à Armelle Le Champion, une source inépuisable de bonnes idées et de stimulation scientifique.

Merci à Ariane Larouche, qui n'a jamais hésité à partager les résultats de son travail et sans qui je n'aurais jamais pu m'amuser à calculer des statistiques.

Merci à Laurence Raymond Marchand, celle qui m'a tellement soutenue lors de ces deux dernières années que j'ai maintenant besoin d'un tuteur à tomates afin de rester droite.

Également merci à Doris Ransy, Insaf Salem, Martine Caty, Catherine Gravel, Hinatea Dieumegard ainsi qu'à toute l'équipe du CMIS pour vos précieux conseils.

Évidemment, mes remerciements s'étendent à ma famille et mes amis. Merci de votre support et de votre intérêt pour mes « bibittes » et pour le déroulement de mon projet, et ce même s'il vous apparaissait souvent bien abstrait.

Finalement, merci à mon amour, Dominique Tardif, qui a endossé tous les rôles pour moi : technicien informatique, dictionnaire des synonymes, cuistot, etc. Merci d'avoir recollé les morceaux après chaque découragement. Xoxo.

# Introduction

## 1. Virologie du VHC

### 1.1 Structure et organisation

Le virus de l'hépatite C (VHC) appartient au genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Comme tous les *Flaviviridae*, le VHC est un virus enveloppé d'une double membrane de lipides dans laquelle sont ancrées les protéines d'enveloppe (E). Leur génome est composé d'ARN à polarité positive dont la traduction se fait à partir d'un IRES (« Internal Ribosome Entry Site ») situé dans la région non codante (NCR) en 5' du génome. Le cadre à lecture ouvert du génome de VHC produit une longue polyprotéine de 3011 acides aminés (aa) qui sera clivée par des facteurs cellulaires et viraux en 10 différentes protéines (1).

À l'instar d'autres virus à ARN, le VHC a un taux de mutations élevé ( $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  substitutions de bases par site par année) dû à l'utilisation d'une polymérase ARN sans correction d'erreur (2). En effet, Le VHC est en constante évolution et présente, au travers des populations et au sein d'un même individu, une variabilité représentée par le concept de quasiespèce, soit une famille hétérogène de variantes génétiques d'un même virus. Au niveau de sa distribution mondiale, le génome du VHC est classifié en 7 génotypes et plus de 67 sous-types (3).

Comme illustré à la figure 1, les protéines structurales incluent la capsid (C) et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 qui sont hautement glycosylées. Les protéines non structurales (NS) ont des fonctions multiples dans le cycle de réplication du VHC (révisé dans (1)). P7 est une protéine s'oligomérisant pour former des canaux ioniques et possédant un rôle dans l'assemblage de la capsid et son enveloppement (4). Des complexes formés de NS2-NS3 et NS3-NS4A (A) agissent en tant que protéases et hélicase dans le cas de NS3. Les protéines NS4B et NS5A interagissent avec de nombreux facteurs cellulaires et viraux : grossièrement, ces facteurs servent à l'ancrage de complexes nécessaires à la réplication et/ou à l'assemblage du VHC. Finalement, NS5B est une polymérase ARN-ARN dépendante qui est responsable de la synthèse du brin d'ARN négatif complémentaire au génome viral et de la production de copies positives de ce brin négatif en grande quantité (révisé dans (1)).

En plus de ces protéines, un cadre de lecture alternatif produit la protéine F, qui n'est pas essentielle à la réplication du VHC (5).

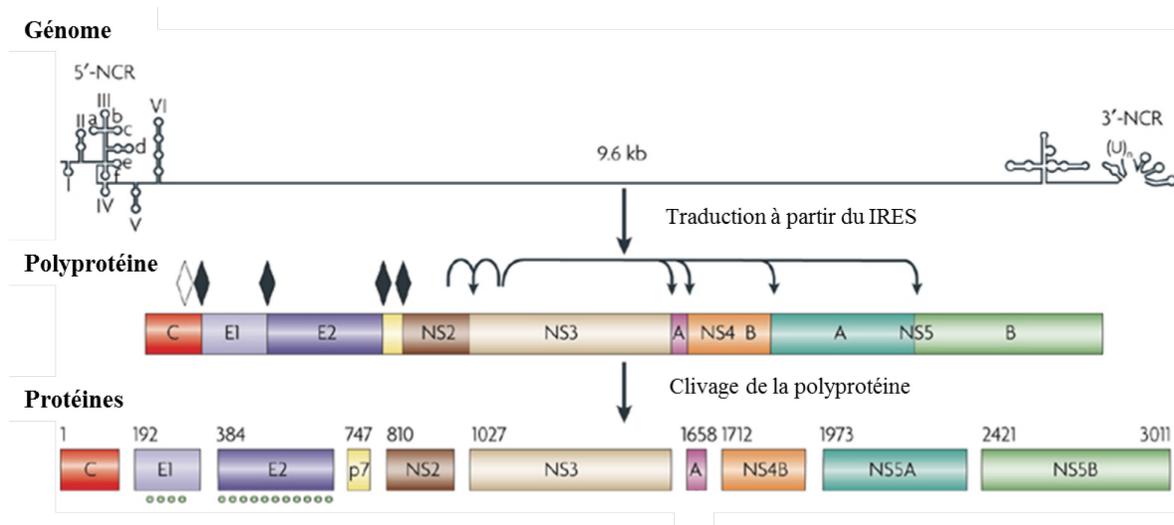


Figure 1. Organisation du génome et fonction des protéines du VHC

Le génome ARN et ses structures secondaires sont illustrés au sommet de la figure, suivi d'une représentation de la polyprotéine et des protéines résultant du clivage de la première. Les losanges blancs et noirs représentent respectivement les sites de clivage par la région carboxyl de la capsidie et par des facteurs cellulaires. Les flèches représentent les sites de clivage par les protéases NS2-NS3 et NS3-NS4A. Les points verts illustrent le nombre de sites de N-glycosylation des protéines de l'enveloppe. « Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology (6), copyright (2017) ».

## 1.2 Cycle de réplication viral

### 1.2.1 Interaction avec les lipides

La densité des virions isolés chez les individus infectés par le VHC est variable, car le virus est présent sous différentes formes, associé ou non avec des lipides de différentes densités. C'est-à-dire que le cycle de réplication est intimement lié au métabolisme des lipides. Par exemple, les lipoprotéines de haute densité (HDL) avec lesquels le VHC partage un récepteur cellulaire, le SR-BI (« Scavenger Receptor B Type 1 »), augmentent l'infectivité du VHC dans des modèles *in vitro* (7-9). D'ailleurs, les lipides jouent également un rôle important dans la réplication et l'assemblage du virus, notons l'association des particules virales avec apoE, une apolipoprotéine jugée essentielle à la formation et à la sécrétion des virions (révisé dans (1, 10)).

Finalement, le recouvrement de la particule virale avec ces différents lipides servirait également de paravent aux antigènes viraux face au système immunitaire (révisé dans (10)).

### **1.2.2 Entrée**

Le VHC infecte les humains et les chimpanzés uniquement et, bien que différents types de cellules aient été proposés comme cible du VHC, son tropisme est majoritairement restreint aux hépatocytes (11). Le premier déterminant du tropisme d'un virus est l'expression des récepteurs d'entrée à la membrane cellulaire. De ce côté, le VHC s'est vu attribuer un nombre impressionnant de récepteurs potentiels dont plusieurs sont impliqués dans le métabolisme des lipides. Cependant, un consensus semble s'être formé autour de SR-BI, CD81, claudine-1 (CLDN1) et occludine (OCLN) (révisé dans (1, 12)).

SR-BI, fortement exprimé dans le foie, permet la fixation initiale du VHC à la cellule par l'interaction avec la région hypervariable 1 (HVR1) de la glycoprotéine E2 et/ou par l'interaction avec des lipoprotéines à la surface du virion (révisé dans (10)). En effet, il a été démontré *in vitro* que des particules virales déficientes pour HVR1 sont encore dépendantes de SR-BI pour l'entrée dans la cellule (13). Par la suite, CD81, une tétraspanine dont l'expression est ubiquitaire, se lie à E2 par sa région LEL (« Long Extracellular Loop ») (révisé dans (14)). CD81 est dynamique dans la membrane plasmique et diffuse naturellement afin de former des complexes avec CLDN1, le troisième récepteur essentiel du VHC. Ce complexe, lors de l'infection par le VHC, participe à l'internalisation des particules virales avec la contribution d'OCLN, qui, tout comme CLDN1, est une protéine de jonctions serrées qui jouerait un rôle tardif dans l'entrée du virus (révisé dans (1)).

Suite à la fixation aux récepteurs cellulaires, le VHC est internalisé dans la cellule par endocytose clathrine-dépendante. Une diminution subséquente du pH permet la fusion de la membrane lipidique virale avec l'endosome et la relâche du génome dans le cytoplasme (15).

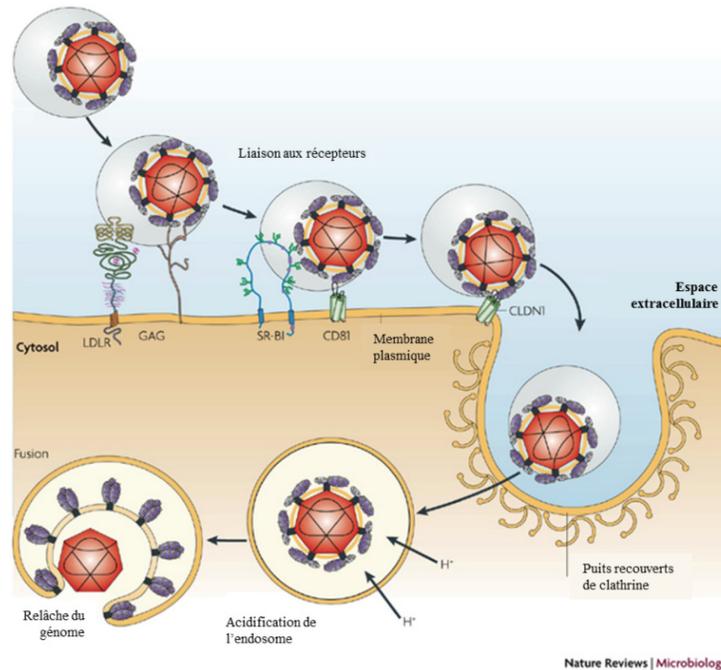


Figure 2. Mécanisme d'entrée du VHC dans un hépatocyte

La particule virale associée à des lipides s'attache à des facteurs d'adhésion (LDLR- « Low Density Lipoprotein Receptor »- et GAG -glucosaminoglycane), puis à différents récepteurs (SR-B1, CD81, CLDN1 et OCLN -non-illustré-). Le virion est ensuite internalisé et son génome est relâché suite à l'acidification de l'endosome. « Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology (6), copyright (2017) ».

### 1.2.3 Réplication, traduction et assemblage

Le tropisme du VHC est également restreint au niveau de sa réplication par l'expression de mir-122, un micro-ARN exprimé dans le foie qui stabilise l'extrémité 5' du génome lors de cette étape (16). La réplication du VHC occasionne un réarrangement massif du cytoplasme qui est alors comparé à une toile de membranes (révisé dans ((1, 6)).

Suite au clivage de la polyprotéine résultant de la traduction à partir d'un IRES, plusieurs protéines sont dirigées vers le réticulum endoplasmique (RE), mais également vers les vésicules lipidiques (VL). C'est notamment le cas de la capsid, qui se trouve au niveau du RE, et de NS5A, qui est dirigé vers ces deux organelles (17). En outre, il a été démontré que la proximité des VL était nécessaire lors de la synthèse des ARN et également lors de l'assemblage des virions afin de produire des particules virales infectieuses (18, 19). Quant à elles, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 possèdent un domaine de rétention membranaire en C-

terminal qui maintient E1 et E2 dans la lumière du RE et qui est impliqué dans la dimérisation de ces protéines. Le dimère non covalent E1E2 est endo-D-résistant et endo-H-sensible, ce qui indique qu'il ne migre pas au-delà du réseau cis-Golgi (20).

Ainsi, les particules virales bourgeonnent dans la lumière du RE et utilisent le système de sécrétion cellulaire, parallèlement à la voie de synthèse des lipoprotéines de très faible densité (VLDL), pour sortir de la cellule. Au cours de leur excrétion, les particules virales s'associent avec différents types de lipides et acquièrent une variété de profils de densité (1, 21).

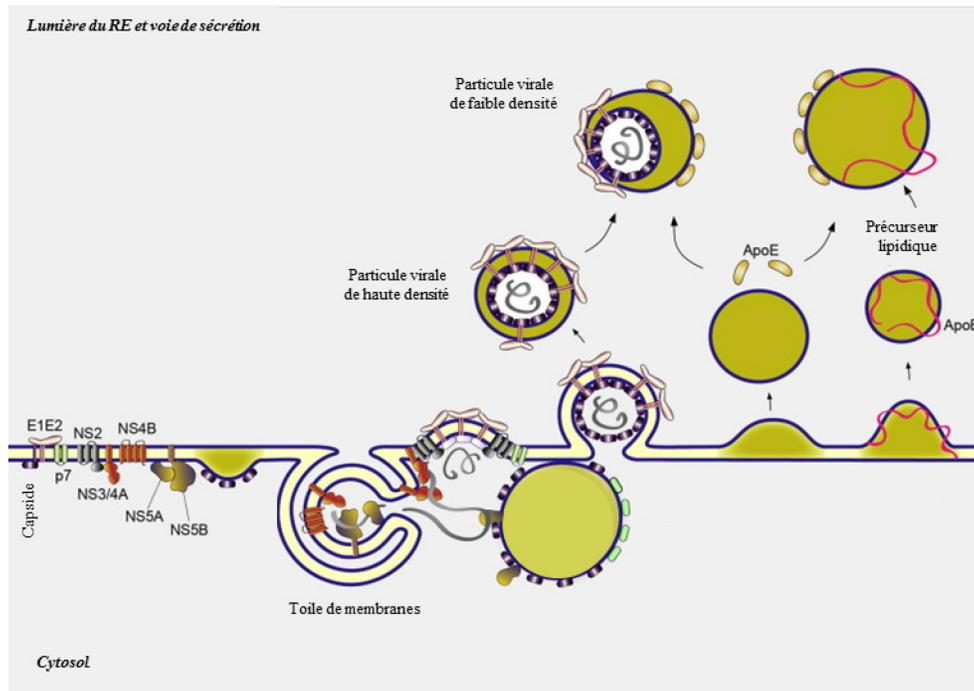


Figure 3. Réplication et assemblage des particules virales

Les différentes protéines structurales et non-structurales associées à la membrane du RE sont illustrées. L'association du cycle de réplication du VHC avec le métabolisme des lipides est visible au niveau de la toile de membranes (réplication) et également au niveau de l'assemblage et de la sécrétion. Les différents types de lipides sont représentés en vert. « Reprinted from Journal of Hepatology, 61 (1), Jean Dubuisson and François-Loïc Cosset, Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle- An update, Pages no S3-S13. Copyright (2017), with permission from Elsevier » (1).

## 2. Pathologie

### 2.1 Historique, modèles expérimentaux et traitements

Premièrement défini comme un agent causant une hépatite non-A, non-B, le VHC a été formellement identifié en 1989 (22). Même avant son isolement, des traitements empiriques à base d'interféron (IFN) de type 1 ont été utilisés (1986) et rapidement améliorés par l'ajout de ribavirine (1998) et l'utilisation d'IFN- $\alpha$  pégylé (2001). Cependant, ces traitements possédaient tous des effets secondaires non-négligeables allant de symptômes similaires à ceux de la grippe, ainsi qu'à des troubles neuropsychiatriques, d'anémie hémolytique ou de maladies auto-immunes (révisé dans (12, 23, 24)).

Le développement d'antiviraux à action directe (DAA) a longtemps été ralenti par le manque de modèles *in vitro* et *in vivo* adaptés. L'utilisation du chimpanzé, le seul autre hôte naturel du VHC, comme modèle d'étude est idéale, mais peu pratique dû à des considérations éthiques. Des modèles de souris humanisées ou de souris chimères avec foie humanisé ont ensuite été développés (révisé dans (12, 25)).

Les modèles *in vitro* ont également contribué à l'avancement des connaissances, bien que leurs débuts aient été difficiles, considérant que le VHC ne se réplique pas naturellement en culture cellulaire. Premier de sa catégorie, le système de réplicons a permis d'étudier les enzymes minimalement nécessaires à la réplication du VHC (26). Le système de pseudoparticules (VHCpp) a suivi en 2003 et a été d'une importance particulière dans cet essai : les VHCpp, des particules lentivirales modifiées pour exprimer E1E2 à leur surface, permettent de récapituler les étapes d'entrée du virus dans la cellule et revêtent une grande importance dans l'étude des anticorps (AC) neutralisants (27). Les VHCcc (VHC dérivé de culture cellulaire) ont finalement été développés à partir d'un isolat clinique, le JFH1 (« Japanese Fulminant Hepatitis-1 »), qui est capable d'effectuer un cycle de réplication viral complet dans des cellules d'hépatomes en culture (28).

Les données recueillies par ces modèles sur le cycle de réplication du VHC ont permis la preuve de concept du premier agent antiviral à action directe, un inhibiteur de la protéase NS3-NS4A. Plusieurs autres classes de DAA ont suivi : inhibiteur de NS5A, inhibiteurs nucléotidiques et inhibiteurs non-nucléotidiques de la polymérase NS5B (12). Premièrement utilisées

conjointement avec les traitements traditionnels, des combinaisons de DAA sont utilisées sans IFN depuis 2014. Ils permettent d'obtenir des réponses virologiques soutenues (SVR) parfois supérieures à 90% (révisé dans (12, 25)).

Malgré les avancées remarquables des dernières années, plusieurs problématiques liées à l'infection par le VHC sont encore d'actualité. Les traitements actuels sont très coûteux et, malgré les arrangements faits avec certains gouvernements, il semble irréalisable de pouvoir traiter l'intégralité des personnes infectées par le VHC, soit 185 millions d'individus. De plus, la résistance aux DAA est déjà observée et pourrait compliquer les procédures de traitement. L'infection par le VHC est asymptomatique chez la majorité des patients, ce qui complexifie le dépistage et augmente les risques de transmission interindividuelle du VHC. C'est dans ce contexte que le développement d'un vaccin, qui est sans cesse compliqué par l'habileté du VHC à éviter la réponse immunitaire, prend toute son importance (révisé dans (29-31)).

## **2.2 Évolution naturelle de l'hépatite C**

Pour les 185 millions d'individus infectés par le VHC, 15 à 25% guériront spontanément de l'hépatite C en phase aigüe de la maladie. La phase aigüe de l'hépatite C, soit les 6 premiers mois suivants l'infection, est caractérisée par une augmentation d'ARN viral jusqu'à  $10^5$ - $10^7$  unités/ml suivie d'une élévation des niveaux d'alanine aminotransférase (ALT) à des niveaux 10 fois plus hauts que la normale. C'est dans cette période que la majorité des symptômes, bénins et non-spécifiques, sont observés (fatigue, nausée, perte d'appétit, etc.) (révisé dans (32-35)).

Inversement, chez 75 à 85% des individus infectés, l'hépatite C évolue en phase chronique. Les symptômes, comparables à ceux de la phase aigüe, sont peu fréquents et limités aux moments où les niveaux d'ALT sont largement supérieurs à la normale. En effet, la virémie et le degré d'inflammation hépatique varient durant la phase chronique (32). De manière plus grave, des maladies du foie, telles que la fibrose, la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire, surviennent de nombreuses années après le début de l'infection (36). Ces complications font de l'hépatite C la cause la plus commune de transplantation du foie en Amérique du Nord (35).

## 2.3 Transmission

La transmission du VHC s'effectue par contact direct avec des fluides corporels contaminés. Notons par exemple l'utilisation de drogues injectables et le monitoring insuffisant des produits de transfusion comme facteurs de risque. Ce dernier ne représente heureusement plus un problème dans les pays développés depuis 1992, année où le criblage systématique des produits biologiques a été instauré (35).

### 2.3.1 Transmission de la mère à l'enfant

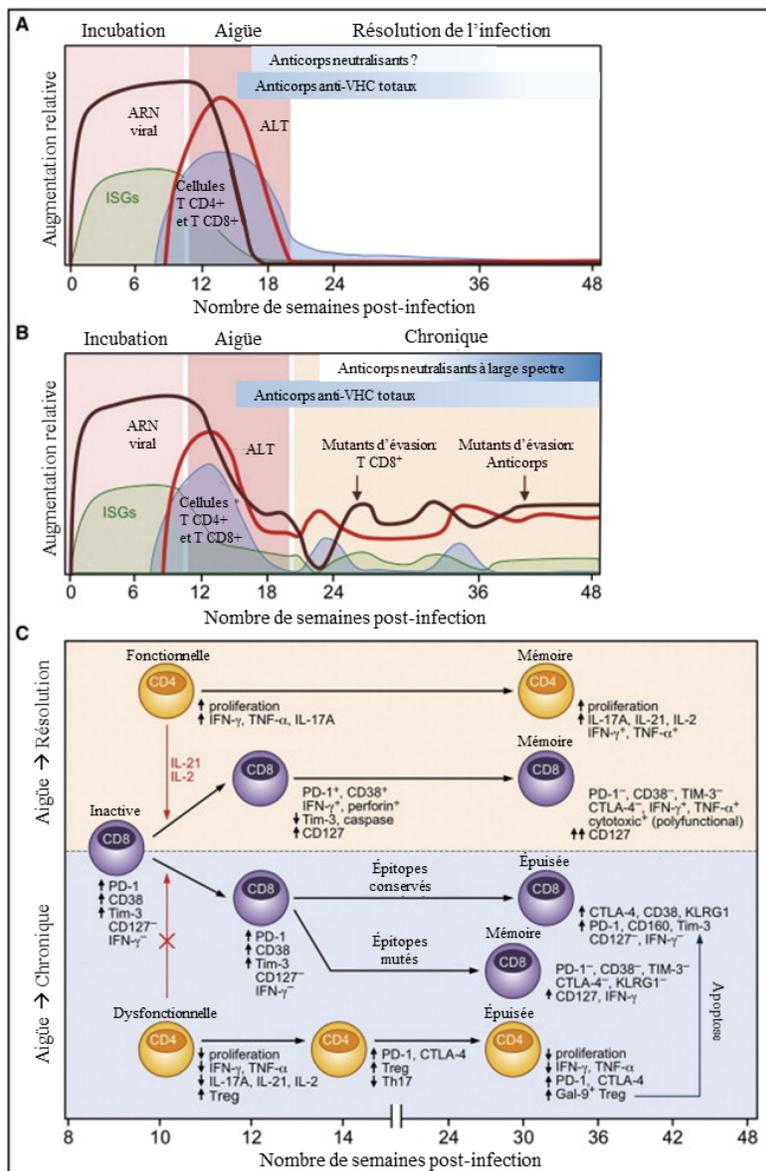
La transmission du VHC de la mère à l'enfant (TME) est également possible et survient dans moins de 10% des cas (révisé dans (37-40)). Un tiers des occurrences de TME du VHC surviennent *in utero*, comme le laisse soupçonner la présence d'ARN viral chez l'enfant dans les 3 premiers jours de vie (41) et la présence de variantes maternelles antérieures au 2<sup>e</sup> trimestre de grossesse chez l'enfant (Fauteux-Daniel *et al.* 2017. Données non-publiées). Plus de la moitié des cas de TME est plutôt associée à une transmission *in utero* tardive ou *intra partum* (41).

Le mécanisme par lequel le VHC infecte le fœtus est mal défini. Une des hypothèses est que des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) infectées par le VHC agissent comme transporteur du virus de la mère à l'enfant (révisé dans (37, 42)). Une autre voie d'infection à considérer est la transmission de variantes directement à travers le placenta, constitué de trophoblastes irrigués exprimant certains récepteurs impliqués dans l'entrée du VHC (révisé dans (37)). Bien qu'ils constituent une barrière à plusieurs infections, certains travaux suggèrent que les cytotrophoblastes sont susceptibles au VHC *in vitro* et pourraient participer à la TME (43).

Lors de la TME, une fraction seulement de la quasiespèce est transmise. Les données disponibles ne permettent pas encore de bien comprendre les processus de sélection des variantes transmises, mais des résultats récents jettent un peu de lumière sur le phénomène. En effet, notre équipe de recherche a montré que des variantes fortement ou peu représentées dans la quasiespèce ont le potentiel d'être transmises et que le goulot d'étranglement, qui représente la fraction de variantes transmises, est plus permissif chez les femmes co-infectées avec le VIH (Fauteux-Daniel *et al.* 2017. Données non-publiées).

Les risques de TME sont augmentés par une virémie élevée chez la mère ( $> 10^6$  copies/ml), par la présence d'inflammation hépatique élevée dans l'année précédant la grossesse et à l'accouchement, par une rupture prolongée des membranes avant l'accouchement et également par la co-infection de la mère par le VIH (révisé dans (37-40)). Cependant, ce dernier point ne constitue plus un facteur de risque si les femmes sont sous thérapie antirétrovirale combinée (cART) qui permet de maintenir les niveaux de VIH sous la limite de détection et de rétablir des décomptes normaux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (44-46).

### 3. Immunité



#### Figure 4. Contribution des réponses immunitaires dans la résolution spontanée de l'infection en phase aigüe ou dans le développement de la chronicité

La distribution temporelle des différentes réponses immunitaires, de l'ARN viral et de l'ALT sont illustrées aux différentes phases de la maladie par des courbes (ISG-gènes stimulés par l'IFN-, ARN viral et lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>) ou par des gradients de tonalité (réponses humorales) lors de la résolution spontanée (A) ou lors du développement en phase chronique (B) de l'infection. L'état fonctionnel des lymphocytes T et les différentes voies métaboliques induites ou réprimées sont schématisés en fonction de la finalité de l'infection (C). « Reprinted from *Immunity*, 40 (1), *Immune Responses to HCV and Other Hepatitis Viruses*, Pages no 13-24, Copyright (2017), with permission from Elsevier » (47).

### **3.1 Immunité innée**

Plusieurs intermédiaires de réplication du VHC sont reconnus par des facteurs de l'immunité innée comme l'IRES par la protéine kinase R (PKR), la queue poly U/UC 3' par RIG-1 ou les structures ARN double brin par le TLR-3 (« Toll-Like Receptor-3 ») (révisé dans (34, 47, 48)). Après reconnaissance du pathogène, ces voies mènent à l'induction d'IFN- $\beta$  et d'autres molécules inflammatoires. Cependant, ces mesures antivirales sont contrebalancées par des mécanismes propres au VHC : il a été démontré que le complexe NS3-NS4A, E2 et NS5A interviennent à différents niveaux afin de bloquer l'induction de l'IFN- $\beta$  et des ISG. Néanmoins, ces molécules inflammatoires favorisent le recrutement d'autres cellules immunitaires (révisé dans (34, 47, 48)). Notons par exemple les macrophages (cellules de Kupffer), les cellules dendritiques et les cellules NK (« Natural Killer »), lesquels contribuent à l'instauration d'un environnement pro-inflammatoire et à l'organisation de la réponse immunitaire adaptative.

#### **3.1.1 Cellules NK**

Ces cellules jouent un rôle important dans la résolution de l'hépatite C en phase aigüe et possiblement dans la phase chronique, comme il sera abordé subséquemment. Les cellules NK sont enrichies dans le foie (25-30% des lymphocytes), ce qui en fait des candidates idéales pour contrôler l'infection par le VHC (49).

Les cellules NK sont aptes à reconnaître les cellules du « non-soi » qui n'expriment pas le CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) et les cellules du soi qui sont modifiées à la suite d'une infection par un pathogène ou du développement d'un cancer. Ce sous-type lymphocytaire exprime une multitude de récepteurs, inhibiteurs ou activateurs. L'intégration

des signaux, parfois redondants, en aval de ces récepteurs, détermine si la cellule NK sera activée et si oui, quel profil elle adoptera (50). Globalement, ces cellules ont deux différents profils : cytotoxique ( $CD56^{\text{diminué}}CD16^+$ ) et productrice de cytokine ( $CD56^{\text{élevé}}CD16^-$ ). Les premières expriment la perforine, qui est relâchée par dégranulation et provoque la formation de pores dans la cellule infectée. Les secondes produisent rapidement de l'IFN- $\gamma$  à des niveaux supérieurs aux cellules NK cytotoxiques (51).

L'activation élevée des cellules NK cytotoxiques, ainsi que la présence de certains polymorphismes génétiques ont été associés à la résolution de l'infection en phase aigüe et/ou à une meilleure réponse au traitement par l'IFN- $\alpha$  (52-54).

## **3.2 Immunité adaptative**

La réponse immunitaire adaptative apparaît tardivement dans l'hépatite C: les lymphocytes T  $CD4^+$  et T  $CD8^+$  apparaissent 6 à 8 semaines après l'infection (34, 47), alors que les cellules B spécifiques au VHC apparaissent 7 à 8 semaines après l'infection (34, 55). Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer l'apparition tardive de l'immunité adaptative. Une d'entre elles concerne la nature tolérogénique du foie qui est constamment exposé à des protéines étrangères dérivées des nutriments ou de la flore microbienne normale. Cet aspect ferait du foie un organe susceptible aux infections chroniques (56). De plus, le VHC peut également se transmettre par contact direct de cellule-à-cellule ce qui contribue à l'évasion de la réponse immunitaire humorale (57).

### **3.2.1 Lymphocytes T $CD4^+$**

De manière simplifiée, les lymphocytes T  $CD4^+$  peuvent être divisés en 4 catégories : les lymphocytes T « helper » (auxiliaires) Th1, Th2 et Th17 et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Chacun de ces sous-types a un rôle à jouer dans la résolution ou la chronicité de l'hépatite C. Dans le contexte d'une infection par le VHC, une réponse T  $CD4^+$  étendue et vigoureuse est importante dans la résolution spontanée de l'infection en phase aigüe. En effet, certains facteurs propres aux lymphocytes T  $CD4^+$  prédisent une résolution spontanée de l'infection. La présence de fortes réponses prolifératives spécifiques aux protéines non-structurales du VHC ainsi que la production élevée de cytokines de type Th1 et de cytokines inflammatoires sécrétées par les lymphocytes Th17 (p.ex. IL-17 et IL-21) en font partie. Cependant, lors de l'évolution vers la

phase chronique de l'infection, les cellules T CD4<sup>+</sup> perdent de leur capacité de prolifération et de production de cytokines et disparaissent en périphérie (révisé dans (34, 47, 58)). Cette situation s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des lymphocytes Treg en périphérie. Ces derniers ont un effet immunomodulateur sur les T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> par la sécrétion d'IL-10 et leur essor contribue à modifier la représentation des autres sous-types de cellules T CD4<sup>+</sup>(59).

Puisqu'ils fournissent des signaux de stimulation à d'autres types de lymphocytes, les effets de l'épuisement des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> se répercute à différents niveaux comme nous verrons plus loin.

### **3.2.2 Lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Chez les patients n'évoluant pas vers la phase chronique de l'hépatite C, les populations de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC reconnaissent plus d'épitopes, particulièrement sur NS3, que chez les patients évoluant vers la phase chronique (60-62). Les cellules T CD8<sup>+</sup> sont inactives au début de la phase aiguë et leur activation subséquente favorise la résolution spontanée et le développement d'un phénotype mémoire (47). L'échec de la réponse T CD8<sup>+</sup> est associé à des mutations d'évasion dans le génome viral, à la perte de la stimulation par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et Th17 (59), ainsi qu'à l'apparition de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> présentant un profil d'épuisement (révisé dans (34, 47, 48)).

### **3.2.3 Réponses humorales**

L'importance de la réponse humorale dans la résolution de l'infection par le VHC en phase aiguë, ainsi que dans l'évolution de la maladie, ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique. Les arguments contre l'importance de l'impact de la réponse humorale anti-VHC se résument comme suit : 1) les titres d'AC anti-VHC sont bas et diminuent rapidement suite à la résolution spontanée de l'infection; 2) certains individus éliminent le VHC sans développer de réponse humorale détectable; 3) des études chez les chimpanzés montrent que la présence d'AC ciblant les protéines d'enveloppe E1 et E2 ne corrèle pas avec la résolution spontanée de l'infection; et 4) la morphologie (association avec des lipides) et l'évolution rapide du VHC en réponse à l'immunité humorale rendent difficile la production d'AC neutralisants à large spectre (révisé dans (31, 34, 48, 63)).

Les évidences allant dans le sens contraire sont tout aussi nombreuses : 1) l'induction rapide d'AC neutralisants corrèle avec la résolution spontanée de l'infection; 2) l'induction retardée des AC neutralisants est associée avec l'évolution en phase chronique de la maladie; 3) l'injection d'AC neutralisants à large spectre prévient l'infection aiguë et contrôle l'infection chronique chez les chimpanzés; et 4) chez les patients ayant des dysfonctions du compartiment lymphocytaire B (hypogammaglobulinaemia et traitement au rituximab), la rapidité et la sévérité de la maladie ainsi que la virémie sont augmentées (révisé dans (31, 34, 48, 63)).

On peut retirer de toutes ces informations que la production d'AC neutralisants à large spectre est possible, mais que leur efficacité est altérée par la variabilité du VHC et l'inaccessibilité des épitopes d'intérêt. De plus, il est probable que l'interaction entre le virus et le système immunitaire durant la phase chronique de l'infection favorise la perte d'aptitude évolutive (« fitness ») du VHC, au niveau répliatif et infectieux, et contribue au contrôle de la maladie (64).

### **3.2.3.1 Diversification de la quasiespèce**

Les virus utilisant une polymérase ARN-ARN dépendante, comme le VHC, ont les taux de mutations les plus élevés parmi les différents types de virus, soit  $1,5 \times 10^{-3}$  mutations par site par cycle de répliation, ce qui leur confère un avantage évolutif dans les environnements changeants (65). Dans le cas du VHC, la majeure partie de la variabilité se situe au niveau des régions hypervariables de la glycoprotéine d'enveloppe E2: HVR1 (aa 384-410), qui est la plus caractérisée, puis HVR2 (aa 474-482) et HVR3 (aa 431-466) (66, 67). La quasi-totalité des mutations non-synonymes sont contenues dans les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, et plus de la moitié sont concentrées dans la région HVR1. Inversement, le taux de mutations non-synonymes est stable dans les gènes non-structuraux (64). La pression évolutive augmentée sur des protéines exposées au sérum laisse supposer l'implication de la réponse humorale dans la diversification de la quasiespèce (68-70). L'aptitude évolutive d'un virus est affectée entre autres par sa capacité à se répliquer, à se transmettre ou à échapper à la réponse immunitaire (71). En effet, l'évasion immunitaire d'une variante peut être accompagnée par une réduction de son aptitude évolutive, par exemple au niveau de l'infectivité (72). Cette baisse d'aptitude est particulièrement visible lors d'un changement au niveau de la pression immunitaire, par

exemple par l'infection d'un nouvel hôte, où les mutations d'évasion ont tendance à retourner vers la séquence consensus (73).

### 3.2.3.2 Structure de E1E2 et AC neutralisants

L'hétérodimère E1E2 forme une structure compacte, globulaire et fortement glycosylée. Jusqu'à 5 et 11 sites de glycosylation sont présents sur E1 et E2 respectivement. Ces derniers contribuent à camoufler les épitopes conservés et participent à l'adhésion du virus à la cellule (74). La région HVR1 a un rôle similaire, avec sa structure flexible et exposée : elle contribue directement à la fixation de E2 à SR-B1 et indirectement par l'interaction avec les lipoprotéines associées (75). Les AC neutralisants ciblant cette région ne permettent pas la neutralisation à large spectre (31). Cependant, lorsque HVR1 est muté ou excisé du génome viral, la neutralisation croisée des particules virales est augmentée *in vitro*, car les épitopes impliqués dans l'interaction avec CD81 sont plus exposés (75, 76). En effet, les AC neutralisants à large spectre répertoriés à ce jour (HCV1, AR1, AR3A-C, etc.) ciblent les régions conservées responsables de l'interaction avec CD81 (77-80). Pour leur part, les régions HVR2 et IgVR (« Intergenic Variable Region ») sont nécessaires à l'hétérodimerisation avec E1 (76). Cette dernière est peu exposée et peu immunogénique (74).

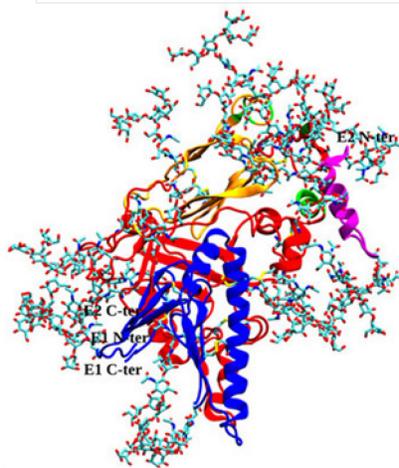


Figure 5. Modèle de l'hétérodimère E1E2

Les protéines E1 et E2 sont respectivement peintes en bleu et rouge. Les glycanes liées à E1E2 sont illustrées par les structures bleu pâle avec les extrémités rouges. HVR1 est coloré en mauve et le site de liaison à CD81 en vert. Adapté de (74).

### 3.2.4 ADCC

#### 3.2.4.1 Mode d'action

L'ADCC, ou la cytotoxicité cellulaire dépendante des AC, est une réponse immunitaire particulièrement importante dans le contrôle des infections virales ou des cancers. Elle se situe à l'interface de l'immunité innée et adaptative, puisqu'elle fait intervenir des éléments appartenant à chacune. De l'immunité adaptative, l'ADCC utilise les AC, qui reconnaissent et fixent les épitopes viraux exprimés à la surface des cellules infectées. Ces complexes immuns sont ensuite reconnus par des cellules immunitaires qui possèdent des récepteurs spécifiques aux régions Fc des AC, soit les FcγRIII ou CD16 (81). Ceux-ci sont exprimés par des cellules de l'immunité innée, comme les cellules NK, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles (82). De par son importance dans le contrôle de l'infection par le VHC, l'ADCC médiée par les cellules NK sera plus longuement approfondie. Ces cellules expriment le FcγRIIIA, qui lie tous les sous-types d'IgG selon différentes affinités (IgG3>IgG1>IgG2>IgG4) (83).

Les cellules NK initialisent les voies apoptotiques des cellules infectées par la relâche de granules cytotoxiques suite à leur activation par CD16. La dégranulation des cellules NK libère des perforines et des granzymes (Grz) dans la synapse immunologique. Les Grz sont des sérines protéases qui induisent l'apoptose par l'induction de la voie des caspases ou par le déclenchement de dommages mitochondriaux (84). Les molécules de perforine s'assemblent sur la membrane de la cellule cible et forment des pores qui permettent l'entrée massive de Grz, soit directement, soit par un mécanisme d'endocytose initié par un influx de  $Ca^{2+}$  résultant de la formation des pores (révisé dans (84-86)).

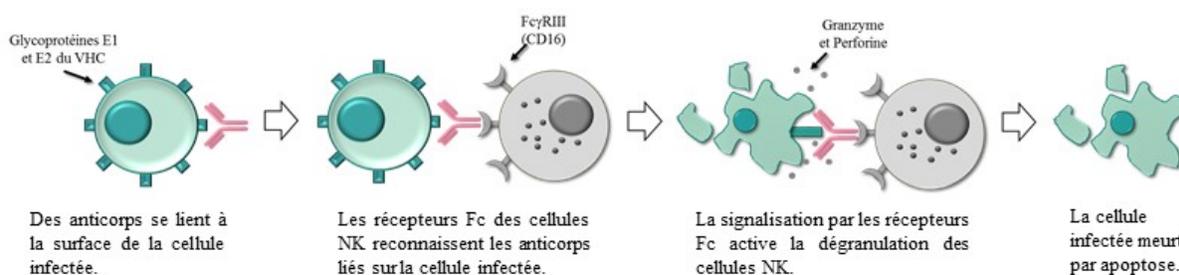


Figure 6. Mécanisme de l'ADCC

#### **3.2.4.2 Implication dans les infections virales**

L'ADCC est largement reconnue comme étant une voie d'action importante des AC non-neutralisants dans le contrôle des infections virales, comme l'influenza, le virus Ebola et le VIH (87-89). L'intérêt pour l'ADCC dans les infections virales est grandement lié à l'essai vaccinal RV144 contre le VIH, qui a obtenu une efficacité de protection de 31,2% et dont le succès a été en parti attribué à la production d'AC pouvant diriger l'ADCC (90).

Lors d'une infection virale, certains constituants viraux peuvent se retrouver à la surface de la cellule infectée et être reconnus par des AC. On parle par exemple de virions bourgeonnant à la membrane plasmique ou des particules virales liées aux cellules. C'est en reconnaissant ces déterminants viraux liés aux AC que l'ADCC pourrait détruire des foyers d'infection viraux et également des cellules non-infectées (91).

#### **3.2.4.3 Le cas de l'hépatite C**

L'équipe de Dumonceaux *et al.* et l'équipe de Drummer *et al.* ont démontré que, malgré la présence de domaine de rétention de E1E2 dans le RE, les glycoprotéines d'enveloppe du VHC se rendaient à la surface de la cellule *in vitro* (92, 93). Cela indique que des épitopes viraux peuvent être exprimés à la surface des hépatocytes infectés par le VHC, et que ces derniers peuvent être reconnus et détruits par l'ADCC. Il est intéressant de noter que, lors de la phase chronique de l'infection par le VHC, la proportion des cellules NK CD16<sup>+</sup> augmente, ainsi que leur activité cytotoxique (94, 95).

Une étude par Nattermann *et al.* a montré que des AC prélevés de patients infectés par le VHC permettent d'initier l'ADCC sur des cellules Jok-1 recouvertes de la glycoprotéine d'enveloppe E2. Cependant, ils n'ont pas observé de différences significatives entre l'amplitude de la réponse ADCC chez des patients en phase aigüe, des patients ayant résolu l'infection ou des patients en phase chronique (96). Néanmoins, il semble que les cellules NK participent aux dommages hépatiques puisqu'en phase chronique, la dégranulation de ces cellules corrèle avec les niveaux d'ALT (97). Dans l'ensemble, les données limitées sur ce sujet ne permettent pas à ce jour de bien définir l'implication de l'ADCC dans l'évolution de la pathologie liée au VHC.

#### 3.2.4.4. Modèles expérimentaux

Historiquement, l'ADCC a été mesuré *in vitro* par un essai de relâche de chrome-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ). Dans ce modèle expérimental, les cellules cibles sont marquées avec le  $^{51}\text{Cr}$  qui est relâché, puis quantifié dans le milieu lorsque les cellules cibles sont lysées par l'action des cellules effectrices (98). Depuis, différents essais ont été développés afin de contourner les limitations techniques allant de pair avec l'utilisation de réactifs radioactifs. La plupart de ceux-ci utilisent des marqueurs membranaires non-spécifiques en plus de marqueurs de viabilité pour identifier les cellules cibles et leur pourcentage de mortalité en cytométrie en flux (96, 99-101). D'autres essais tirent plutôt avantage de voies métaboliques initiées par l'ADCC : Parekh *et al.* ont modifié les cellules cibles pour que la signalisation en amont du récepteur Fc $\gamma$ RIII active le gène de la luciférase, alors que Pollara *et al.* ont quantifié l'activité des granzymes délivrées dans les cellules cibles grâce à des substrats fluorescents (102, 103). La majorité de ces nouveaux essais utilisent les cellules CEM-NK<sup>R</sup>, une lignée de lymphocyte T humain (99-101, 103). L'utilisation de cette lignée cellulaire est particulièrement pertinente dans les essais d'ADCC, car elle est résistante à la lyse par les cellules NK à l'exception de celle médiée par l'ADCC. Ainsi, l'utilisation de cette lignée permet de diminuer drastiquement la lyse non-spécifique des cellules cibles (104).

## 4. Co-infection avec le VIH

Près du tiers des personnes infectées par le VIH sont également porteuses du VHC. En effet, tout comme le VHC, le VIH se transmet par contact avec des fluides corporels contaminés. Cette route d'infection partagée fait en sorte que la prévalence pour ces deux infections parmi les utilisateurs de drogues injectables est très élevée (105).

Un effet notoire de l'infection par le VIH est la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup>. Ces lymphocytes constituent la fondation de nombreuses réponses immunitaires adaptatives, que ce soit par la stimulation d'effecteurs cytotoxiques ou de cellules B productrices d'AC (106, 107). Ainsi, il a été observé que lors de la co-infection par le VIH et le VHC, les complications hépatiques liées aux VHC étaient accélérées et reliées à la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (105, 108). Inversement, la cART du VIH permet d'améliorer les taux de mortalité reliée à l'insuffisance hépatique (109). Plus spécifiquement, il a été démontré que le niveau de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

est important pour maintenir une réponse T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> spécifique au VHC de qualité (110). De plus, une diminution dans le compte de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> a été associée avec une réduction des niveaux d'AC spécifiques au VHC, ainsi qu'à une diminution du titre d'AC neutralisants (111, 112). Les niveaux d'AC neutralisants spécifiques au VHC tendent à se normaliser sous cART (111, 112).

## **5. VHC et grossesse**

### **5.1 Pathologie et immunité**

La grossesse est une période immunitaire particulière dont les subtilités sont encore aujourd'hui mal comprises. De manière générale, la réponse humorale Th2 est augmentée au détriment de la réponse à médiation cellulaire (113). Ce schème est utilisé pour expliquer la tendance à la hausse de la virémie du VHC lors de la grossesse, mais également la diminution des niveaux d'ALT (révisé dans (39, 114)). En effet, les variations dans les taux d'ALT ont été maintes fois associées à la réponse immunitaire cellulaire contre le VHC plutôt qu'à l'action directe de ce virus non-lytique (91, 115-117). Suite à l'accouchement, la résurgence subite des niveaux d'ALT pourrait être associée avec la reprise de la réponse immunitaire à médiation cellulaire et parfois même avec une résolution spontanée de l'infection (118, 119)

Bien que ces informations renforcent l'importance du rôle de la réponse cellulaire dans le contrôle de l'infection par le VHC, il serait simpliste de résumer ainsi la pathologie de cette infection lors de la grossesse. De fait, des réponses humorales et cellulaires spécifiques au VHC sont observables chez les femmes enceintes, malgré le dogme énoncé plus haut (120). De plus, une pression sélective sur la glycoprotéine d'enveloppe E2 est détectable lors de la grossesse et contribue à l'évolution de la quasiespèce (67). Comme mentionné précédemment, la diversification de la quasiespèce pourrait être attribuable à la réponse humorale maternelle, dont le rôle dans le contrôle de l'infection lors de la grossesse reste à déterminer.

À cause de l'implication des cellules NK dans la résolution de l'infection en phase aiguë, il est très intéressant de constater que l'activité cytotoxique de ce sous-compartiment lymphocytaire est augmentée chez la femme enceinte infectée par le VHC (121, 122). L'expression du FcRIIIa, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et la dégranulation sont augmentées chez les cellules NK recrutées aux

trophoblastes des femmes enceintes infectées (121). L'activité cytotoxique NK pourrait donc être un élément important de la réponse immunitaire dans le contrôle de l'infection à l'interface materno-fœtale.

## **5.2 Traitement**

Les traitements traditionnels, soit la ribavirine et l'IFN- $\alpha$  pégylé, sont contre-indiqués lors de la grossesse. La ribavirine est tératogène et l'IFN figure sur dans la catégorie C des médicaments contre-indiqués pendant la grossesse selon la FDA (123). Les nouveaux DAA n'ont pas encore été testés chez la femme enceinte, mais ils sont conjointement administrés avec la ribavirine, qui permet d'augmenter les SVR et de diminuer les risques de résistances et de rechutes (124). Ainsi, les traitements actuels ne sont pas adaptés à la femme enceinte.

## 6. Hypothèse et objectifs

L'essor de nouveaux modèles de culture *in vitro* du VHC (VHCpp et VHCcc) a permis de reconnaître l'implication de la réponse humorale anti-VHC dans la progression clinique de l'hépatite C, par exemple par la découverte d'AC neutralisants à large spectre. Néanmoins, il n'existe que très peu de données concernant les réponses immunitaires gravitant autour des AC lors de la grossesse.

En effet, l'évolution de l'hépatite C durant la grossesse est mal comprise. La charge virale du VHC augmente au 3<sup>e</sup> trimestre de gestation pour ensuite redescendre après l'accouchement. De plus, suite à l'accouchement, une proportion importante de porteuses du VHC subira une augmentation significative des marqueurs sériques d'inflammation du foie, ce qui mènera dans certains cas à une détérioration de la fonction hépatique. En outre, des résultats obtenus au sein de notre équipe de recherche montrent que l'évolution des variantes durant la grossesse est influencée par la présence de pression sélective sur les protéines d'enveloppe du VHC.

**De ce fait, notre hypothèse de recherche est que la réponse immunitaire humorale maternelle dirigée contre le VHC, réponse qui pourrait être modulée durant la grossesse, serait responsable de cette dynamique.**

La fonctionnalité des AC extraits du sérum des patientes infectées par le VHC sera évaluée par deux tests fonctionnels *in vitro* :

Dans un premier temps, l'activité ADCC spécifique au VHC sera analysée par cytométrie en flux par quantification de la lyse spécifique de cellules cibles CEM-NK<sup>R</sup> exprimant E1E2 à leur surface.

Dans un second temps, la réponse humorale neutralisante sera évaluée par la baisse d'infectivité de VHCpp dans un modèle d'infection de lignée d'hépatomes (Huh 7.5) en présence d'AC extraits du sérum de patientes infectées à différents stages de la grossesse.

Les résultats de cette étude longitudinale seront intégrés avec des données cliniques et expérimentales (charge virale du VHC, structure de la population virale, inflammation hépatique, TME, etc.) et permettront de clarifier l'implication de la réponse humorale dans le contrôle de l'infection par le VHC lors de la grossesse.

## **Matériel et méthodes**

### **1. Culture des cellules**

Les cellules HEK 293T (« Human Embryonic Kidney ») et Huh 7.5 étaient maintenues en croissance dans du DMEM complet (« Dulbecco Modified Eagle medium ») contenant 10% sérum de veau fœtal (SVF) (Wisent, Québec, Can), 12,5 mM d'HEPES (Thermo Fisher Scientific, Waltham, É-U) et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, É-U). Le milieu de croissance était additionné de puromycine (Thermo Fisher Scientific), de blasticidine (InvivoGen, San Diego, É-U) ou d'hygromycine B (Invitrogen, Carlsbad, É-U) aux concentrations respectives de 2 µg/ml, 5 µg/ml et 200 µg/ml.

Les passages cellulaires ont été effectués comme suit : 5 ml de PBS (« Phosphate Buffered Saline ») (Wisent, Québec, Can) ont été versés délicatement sur les cellules ayant adhéré dans un flacon de culture cellulaire T75. Le PBS a ensuite été remplacé par 7 ml de PBS-EDTA (Sigma-Aldrich, St-Louis, É-U) pour les HEK 293T et 2,5 ml de Trypsine-EDTA (Thermo Fisher Scientific) pour les Huh 7.5. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 10 minutes, 8 ml de DMEM complet ont été ajoutés aux cellules qui ont par la suite été centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes. Une fois resuspendues dans 10 ml de DMEM complet, 2 ml de suspension cellulaire et 10 ml de DMEM complet ont été utilisés pour ensemercer un flacon T75.

Les cellules CEM-NK<sup>R</sup> et l'hybridome H53 étaient maintenus dans du RPMI 1640 (« Roswell Park Memorial Institute media ») 10% SVF additionné de 50 µg/ml de gentamycine (Wisent). Les passages cellulaires ont été effectués en diluant la suspension cellulaire dans du milieu frais (1 /10).

### **2. Production de vecteurs**

#### **2.1 Transformation, amplification et purification de plasmides.**

Des bactéries *Escherichia coli* rendues chimiquement compétentes selon le protocole distribué par Zymo Research (Irvine, É-U) ont été transformées en ajoutant 1 µl du plasmide d'intérêt dans 50 µl de suspension bactérienne. Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur des

pétris LB contenant de l'ampicilline ou de la kanamycine. Les plasmides produits par les bactéries transformées ont été isolés par minipréparation selon le protocole fourni par Invitrogen (Carlsbad, É-U).

## **2.2 Vérification de l'intégrité des plasmides isolés : digestion enzymatique et séquençage.**

L'intégrité des plasmides isolés et la présence de l'insert, ont premièrement été vérifiées par digestion enzymatique. Brièvement, 1 µg d'ADN, 1 µl d'enzymes de restriction FastDigest (Thermo Fisher Scientific), 2 µl de tampon FastDigest 10X (Thermo Fisher Scientific) ont été incubés dans une solution aqueuse à 37°C pendant 5 minutes. Le poids moléculaire des produits de digestion a été vérifié par migration sur gel d'agarose 1%. Une deuxième vérification de certains vecteurs a été faite par séquençage. Les agents de sélection, les enzymes de restrictions, les produits de digestion attendus et les amorces utilisées pour chaque vecteur sont présentés à l'Annexe 1.

## **2.3 Gateway : Réaction de recombinaison par la LR clonase.**

Le système de clonage Gateway (Thermo Fisher Scientific) s'appuie sur les processus de régulation des phases lytique et lysogène du phage lambda et permet, dans un cadre pratique, de recombiner les régions géniques contenues entre les différents sites *att* et de facilement cloner un gène dans plusieurs vecteurs (125). Le gène *E1E2*, dont la séquence est présentée à l'Annexe 2, avait précédemment été cloné dans le vecteur d'entrée par d'autres membres de l'équipe. Ainsi, il a été possible de procéder directement à l'étape de la recombinaison par la clonase LR afin de synthétiser le vecteur d'expression 530E1E2. Brièvement, 150 ng du vecteur d'entrée pENTR1A (Invitrogen) et du vecteur d'expression pDEST W-530 (Addgene, Cambridge, É-U), ainsi que 2 µl de LR clonase (Invitrogen), ont été dilués dans du tampon TE (10 mM Tris-HCL, 0,1 mM EDTA) et incubés à 21°C pendant 16 h. 1 µl de protéinase K (Invitrogen) a été ajouté à la réaction et incubé 10 min à 37°C. 2 µl de cette solution ont servi à transformer *E. coli* comme décrit précédemment. De manière similaire, les vecteurs d'expression 670E1E2 et 529E1E2 avaient antérieurement été créés par d'autres membres de l'équipe à partir des vecteurs de destination 670.1 et w529\_2 (Addgene).

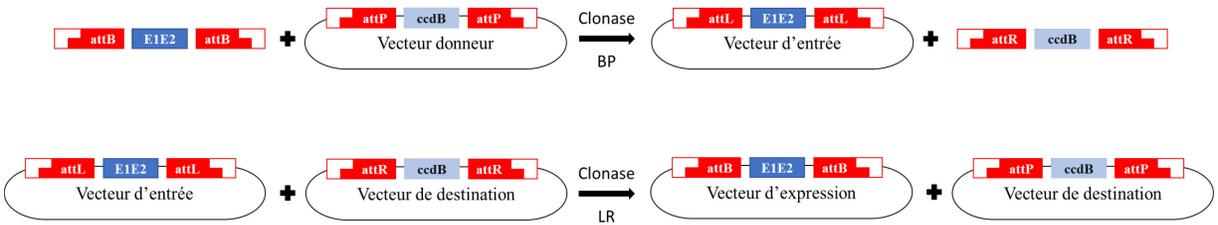


Figure 7. Réactions des clonases BP et LR du système Gateway

Le gène E1E2 a été amplifié par PCR en incluant les sites attB dans les amorces de part et d'autre du gène d'intérêt. Ces sites, ainsi que les sites attP sur le vecteur donneur, sont nécessaires pour la réaction de recombinaison de la clonase BP. Des bactéries *E. coli* ont été transformées par le produit de la réaction de la clonase BP. Les recombinants ont été sélectionnés négativement grâce à la toxicité de CcdB pour *E. coli*. La réaction de la clonase LR permet de transférer le gène d'intérêt du vecteur d'entrée au vecteur de destination sélectionné (670.1; w529\_2 ou w-530). Les transformants sont sélectionnés négativement par l'expression de CcdB dans *E. coli*. Adapté de (125).

### 3. Transduction de cellules eucaryotes

#### 3.1 Lignées cellulaires

Les cellules CEM-NK<sup>R</sup> utilisés au cours des expérimentations décrites subséquemment ont été obtenues à partir d'une lignée de cellules T lymphoblastiques par sélections successives en culture avec des PBMC. Les CEM-NK<sup>R</sup> présentent une sensibilité réduite à la lyse médiée par les cellules NK tout en conservant leur susceptibilité à l'ADCC (104). Cette lignée cellulaire, qui a été modifiée afin d'exprimer les glycoprotéines E1E2 du VHC à leur surface, s'avère un choix indiqué afin de quantifier l'ampleur de la réponse ADCC spécifique au VHC.

Les hépatomes Huh 7.5, des cellules largement utilisées afin d'étudier le cycle de réplication du VHC *in vitro*, ont été utiles à l'étude de la réponse humorale neutralisante anti-VHC dans un modèle d'infection par des VHCpp (voir section 9.3). Accessoirement, les cellules Huh 7.5 ont permis de valider les résultats obtenus au niveau de l'expression de E1E2 dans les CEM-NK<sup>R</sup>.

Les cellules HEK 293T ont principalement été utilisées à des fins de production de lentivirus, mais également comme contrôle positif de transfection et d'infection afin de valider les différentes techniques décrites ci-dessous.

### **3.2 Transfection des HEK 293T pour la production de lentivirus codant pour E1E2.**

Des cellules HEK 293T ont étéensemencées à raison de  $3,81 \times 10^5$  cellules par puits d'une plaque à 6 puits dans du DMEM complet et incubées à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'au lendemain. 1h avant la transfection, le milieu de culture a été remplacé par 3 ml de DMEM 10% SVF sans antibiotique ni HEPES. Les éléments suivants ont été mélangés, vortexés et incubés pendant 15 minutes à  $21^\circ\text{C}$  : 0,3  $\mu\text{g}$  de Rev (pRSV.Rev), 0,4  $\mu\text{g}$  de VSV-G (pMD2.G), 0,8  $\mu\text{g}$  de Gagpol (pMDLg/pRRE) (Addgene), 0,5  $\mu\text{g}$  du vecteur d'intérêt ou du vecteur contrôle pCCLsin-hPGK-GFP et 7,6  $\mu\text{l}$  de PEI (polyéthylèneimine) 1mg/ml et du DMEM. 16h plus tard, le milieu a été remplacé par 4 ml de milieu frais. Après 24h, les surnageants ont été recueillis, filtrés à  $0,45 \mu\text{m}$  (Merck Milipore, Billerica, É-U) et congelés à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation. L'efficacité de transfection a été évaluée par le niveau d'expression de GFP du contrôle positif en cytométrie en flux.

### **3.3 Infection de lignées eucaryotes par des lentivirus codant pour E1E2.**

Pour les lignées adhérentes (HEK 293T et Huh 7.5),  $1,5 \times 10^5$  cellules ont étéensemencées par puits d'une plaque à 12 puits. Le lendemain, le milieu de culture a été remplacé par 1 ml de surnageant contenant les lentivirus. Pour la lignée CEM-NK<sup>R</sup>,  $3 \times 10^5$  cellules ont été suspendues directement dans 1 ml de surnageant. Les lignées ont été infectées pendant 16h et le taux d'expression de la GFP des contrôles positifs a été vérifié 72h plus tard. La même journée, des antibiotiques de sélection (puromycine ou hygromicine B) ont été ajoutés dans les cultures cellulaires.

## **4. Purification d'AC**

### **4.1 Précipitation protéique**

Gracieusement donné par Dr Jean Dubuisson, l'hybridome H53 produit un AC murin anti-E2 conformationnel (126). Ce dernier a été utilisé comme AC primaire en cytométrie en flux pour la détection de la protéine E2 (voir section 5). Le surnageant de culture cellulaire a été précipité au sulfate d'ammonium 0,3 % par agitation magnétique à  $4^\circ\text{C}$ . Les culots obtenus par centrifugation à 4000 rpm pendant 15 minutes à  $4^\circ\text{C}$  ont ensuite été suspendus dans 5 ml de PBS pour chaque 250 ml de surnageant avant précipitation.

## **4.2 Dialyse**

La membrane de dialyse a été hydratée pendant 15 min dans du PBS 1x chaud avant d'être chargée avec les protéines précipitées. 3 bains successifs de 1h, suivi d'un bain de 2h et d'un dernier de 16h ont été effectués dans du PBS 1x sous agitation légère à 4°C.

## **4.3 Purification d'AC sur colonne d'affinité de protéine G.**

Une colonne de 10 cm a été chargée avec 5 ml de protéine G couplée à de la sépharose (GE Health Care, Boston, É-U.). Après 1h, la colonne a été équilibrée avec 100 ml de tampon de lavage ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20mM, pH 7) et 10 ml de tampon de stockage ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20mM, 0,1%  $\text{NaN}_3$ , pH 7), avant d'être conservée à 4°C. Dans l'ordre, 50 ml de tampon de lavage, 50 ml de surnageant dialysé, 50 ml de tampon de lavage et 30 ml de tampon de décrochage (glycine 0,1M, pH 2,7) ont traversé la colonne par gravité. Des fractions de 1 ml récoltées suite à l'ajout de tampon de décrochage ont été recueillies dans 50  $\mu\text{l}$  de tampon Tris 1M (pH 9). Les fractions contenant les IgG ont été identifiées par mesure de la densité optique à 280 nm et dialysées afin d'en changer le milieu. Pour ce faire, 2x 500  $\mu\text{l}$  des fractions positives ont été chargés sur des membranes de dialyse de 100 kDa humidifiées avec du PBS et ont été réduits à environ 25 à 50  $\mu\text{l}$  par centrifugation. De la même façon, 500  $\mu\text{l}$  de PBS ont été ajoutés. Le rétentat a ensuite été récupéré.

## **5. Marquage d'E1E2**

### **5.1 Titrage de H53**

L'AC H53 a été titré par marquage intracellulaire et de surface aux concentrations de 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03 et 0,04 mg/ml en suivant les protocoles décrits plus bas. Les cellules marquées étaient des HEK 293T transfectées avec les vecteurs nécessaires à la production des VHCpp (voir section 9.1). Celles-ci ont servi de contrôle positif dans l'ensemble des marquages.

### **5.2 Marquage intracellulaire**

$1 \times 10^6$  cellules ont été resuspendues dans 100  $\mu\text{l}$  de la solution de fixation et perméabilisation fournie dans l'ensemble Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, San Jose, É-U) et incubées sur glace pendant 20 min. Les cellules ont été lavées 2 fois dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon BD Perm/Wash

1x avant d'être incubées dans une solution d'AC primaire (H53 0,03 mg/ml) pendant 30 min sur glace. Après 2 autres lavages, les cellules ont été incubées dans une dilution 1:100 d'AC secondaire anti-IgG murin FITC (Thermo Fisher Scientific) pendant 30 min sur glace. Finalement, les cellules ont été lavées 1 fois et resuspendues dans du PBS 1x. Les résultats ont été lu sur le FACSCalibur de BD et analysés avec le logiciel FlowJo (Ashland, É-U).

### **5.3 Marquage de surface**

La procédure était identique à celle du marquage intracellulaire, mais les cellules ont été incubées avec 100 µl de SVF afin de bloquer les récepteurs Fc au lieu d'être perméabilisée. De plus, le tampon de lavage utilisé était plutôt du PBS 5% SVF.

## **6. CRISPR-Cas9**

### **6.1 Détermination des cibles et des séquences des ARNg**

Quatre différents ARN guide (ARNg) ont été synthétisés pour déterminer l'emplacement des sites de coupure de l'ADN par la nucléase Cas9 du système CRISPR (« Clustered regularly interspaced short palindromic repeats ») au sein du gène CD81 humain. Des séquences cibles de 19 à 21 nucléotides adjacents à un motif PAM (« proto-spacer adjacent motif ») et ne présentant pas d'homologie ailleurs dans le génome ont été sélectionnées. Pour compléter les ARNg, la séquence du promoteur T7 a été ajoutée en amont des séquences cibles et une région constante codant pour ARNtrac (ARN transactivateur de l'ARN CRISPR), a été ajoutée en aval. Ces séquences ont été synthétisées par ThermoFisher Scientific (GeneArt Strings DNA Fragments).

Tableau I. Séquence nucléotidique des ARNg

ARNg	Séquence nucléotidique
ARNg1	TAATACGACTCACTATAGG <u>GGCGCTGTCATGATGTTTCGT</u> GTTTTAGAGCTAGAAATAG <u>CAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGC</u> <u>TTTTTT</u>
ARNg2	TAATACGACTCACTATAGG <u>CATGATGTTTCGTTGGCTTC</u> CGTTTTAGAGCTAGAAATAG <u>CAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGC</u> <u>TTTTTT</u>
ARNg3	TAATACGACTCACTATAGG <u>ATCTACATCCTCATCGCTGT</u> GTTTTAGAGCTAGAAATAG <u>CAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGC</u> <u>TTTTTT</u>
ARNg6	TAATACGACTCACTATAGG <u>TGAGGTGGCCGCCGCATCTG</u> GTTTTAGAGCTAGAAAT <u>AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGT</u> <u>GCTTTTTT</u>

La séquence du promoteur T7 précède la séquence des cibles des ARNg (surlignés en jaune). En aval de ces dernières se trouve la séquence codant pour l'ARNtrac (souligné).

## 6.2 Transcription *in vitro*

Les fragments d'ADN ont été transcrits et purifiés *in vitro* avec l'ensemble « GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit » (Invitrogen). L'intégrité des ARNg a été vérifiée comme suit : 140 ng d'ARN ont été dénaturés à 70°C pendant 10 minutes, puis ont été chargés sur un gel 10% polyacrylamide TBE-Urée (Bio-Rad, Saint-Laurent, Can). La présence d'une bande à 76 nucléotides confirmait la présence des ARNg.

## 6.3 Transfection

### 6.3.1 Lipofectamine

1 x 10<sup>5</sup> cellules adhérentes (HEK 293T) ont étéensemencées la veille de la transfection dans chaque puits d'une plaque 24 puits. Les mélanges de transfection contenaient : 500 ng de la nucléase Cas9 (Invitrogen), 125 ng de chaque ARNg et 1 µl de lipofectamine Cas9 dans une solution d'Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). Ce mélange a été ajouté à une solution de 1,5 µl de lipofectamine CRISPRmax et 25 µl d'Opti-MEM et distribué sur les cellules. Après 48 h,

les cellules ont été changées de milieu. Le mélange 1 contenait les ARNg 1 et 3, alors que le mélange 2 contenait les ARNg 2 et 6.

### **6.3.2 Électroporation**

L'électroporation a été utilisée pour transférer les CEM-NK<sup>R</sup>, des cellules en suspension. Différents milieux (RPMI ou Opti-MEM), différents voltages (100 à 250 V) et différents nombres de chocs électriques (1 ou 2) ont été utilisés sur le Bio-Rad Gene Pulser afin de déterminer les conditions optimales d'électroporation des CEM-NK<sup>R</sup>. Les critères étudiés étaient le pourcentage de transfection et la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) d'un vecteur contrôle GFP et le pourcentage de viabilité cellulaire. Pour la transfection du système CRISPR, 500 ng de la nucléase Cas9 et 125 ng de chaque ARNg en solution dans de l'Opti-MEM ont été utilisés pour électroporer  $1 \times 10^6$  cellules avec un choc électrique de 220 V.

### **6.4 Marquage de CD81**

La procédure est identique à celle du marquage extracellulaire de E1E2. Cependant, puisque l'AC anti-CD81 (BioLegend, San Diego, É-U) est couplé au fluorochrome PE, les étapes relatives à l'AC secondaire n'ont pas été effectuées. L'anti-CD81 a été utilisé à une dilution 1 :100.

## **7. Liaison de E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup>.**

$5 \times 10^5$  CEM-NK<sup>R</sup> ont été suspendues dans 50  $\mu$ l de solutions à différentes concentrations de E2 soluble (MyBioSource, San Diego, É-U) dans du PBS 0,5% ASB (albumine sérique de boeuf) (Wisent). Une incubation de 1h à 21°C sous agitation légère (200 rpm) a permis la liaison de E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup>. Suite à un lavage dans du PBS 0,5% BSA, un marquage de surface a été effectué directement, 1h ou 3h après la fin de l'incubation.

Dans certaines expérimentations, P1860 (Sigma-Aldrich), un cocktail d'inhibiteurs de protéases, a été ajouté à diverses concentrations pendant l'incubation des CEM-NK<sup>R</sup> avec E2. P1860 a alors été ajouté une fois ou périodiquement aux 30 min.

## **8. ADCC**

### **8.1 Marquage**

Des CEM-NK<sup>R</sup> lavées deux fois dans du PBS 1x ont été suspendues dans du PBS 1x à une concentration de  $20 \times 10^6$  cellules/ml. Un volume identique d'une solution du marqueur de prolifération efluor 670  $10 \mu\text{M}$  (Thermo Fisher Scientific) a été ajouté à cette solution à une concentration finale de  $5 \mu\text{M}$ . Le marqueur de viabilité LIVE/DEAD Aqua (Thermo Fisher Scientific) a été ajouté à une dilution 1 : 1000.

Des PBMC isolés de patients sains par gradient de densité Ficoll ont été lavées deux fois et suspendus dans du PBS 1x à une concentration de  $20 \times 10^6$  cellules/ml. Un volume identique d'une solution du marqueur de prolifération efluor 450  $1,33 \mu\text{M}$  (Thermo Fisher Scientific) a été ajouté à cette solution pour une concentration finale de  $6,67 \mu\text{M}$ . Après une incubation de 20 min à  $21^\circ\text{C}$  à la noirceur, le marquage des PBMCs et des CEM-NK<sup>R</sup> a été arrêté par l'ajout de SVF, suivi d'une incubation sur glace de 5 min. Puis, 3 lavages dans du RPMI 10% SVF ont été effectués.

### **8.2 Extraction et concentration des IgG**

Les IgG ont été extraites avec l'ensemble NAb<sup>TM</sup> Spin Kits de Thermo Fisher Scientific selon le protocole du fabricant. Les IgG ont ensuite été concentrées par dialyse comme décrit précédemment.

### **8.3 Essai ADCC**

L'essai d'ADCC fait intervenir des cellules cibles (cellules CEM-NK<sup>R</sup> modifiées afin d'exprimer E2 à leur surface), des cellules effectrices NK contenues dans les PBMCs et des AC spécifiques à E2 permettant de diriger la lyse des cellules cibles par les cellules NK.

Les cellules CEM-NK<sup>R</sup> et les PBMCs ont tout d'abord été marqués comme décrit précédemment. La moitié des cellules CEM-NK<sup>R</sup> ont été incubées dans une solution contenant la protéine E2 ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) et l'inhibiteur de protéase P1860 comme détaillé antérieurement.

Pour chaque condition de l'essai ADCC,  $1 \times 10^6$  PBMC et  $1 \times 10^5$  CEM-NK<sup>R</sup> recouvertes ou non de la protéine E2 ont été ensemencés dans une plaque 96 puits à fond en « v ». Différents

AC ont été testés pour leur capacité à diriger la réponse ADCC. Deux AC monoclonaux, H53 et AR3B, ont été testés à une concentration de 25 µg/ml (80, 126). L'efficacité d'IgG provenant d'une patiente infectée par le VHC ou d'un individu sain a également été vérifiée directement à partir de sérum (1 :200) ou d'IgG extraits (0,5 mg/ml).

Les cellules et AC ont ensuite été incubés pendant 15 min à 21°C et centrifugés 1 min à 300 x g. Après 4h à 37°C, les cellules ont été fixées dans une solution de formaldéhyde 2% pendant 20 min puis suspendues dans 300 µl de PBS 1x contenant 5 x 10<sup>4</sup> particules «AccuCount» (Spherotech, Lake Forest, É-U). La lecture des résultats s'est effectuée sur le FACS BD LSR Fortessa.

## **9. Activité neutralisante**

### **9.1 Transfection des HEK 293T**

Des cellules HEK 293T ont étéensemencées à raison de 2,8 x 10<sup>6</sup> cellules par pétri (100mm) dans du DMEM complet et incubées à 37°C jusqu'au lendemain. 3h avant la transfection, le milieu de culture a été remplacé par 8 ml de DMEM 10% SVF sans antibiotique ni HEPES. Les éléments suivants ont été mélangés, vortexés et incubés pendant 15 minutes à 21°C : 8,1 µg de pGagpol, 8,1 µg de pLuc, 2,7 µg du plasmide d'intérêt et 62 µl de CaCl<sub>2</sub> 2M (Invitrogen). Les plasmides d'intérêt sont des vecteurs d'expression phCMV des séquences consensus d'E1E2 de différents génotypes du VHC (1a (H77), 1b 12.6, 2b 1.1, 3a 1.28 et 4 11.1). Ces vecteurs nous ont aimablement été offerts par le Dr Alain Lamarre de l'institut Armand-Frappier. Le mélange a été complété à 500 µl avec de l'eau, puis ajouté à du HBS (« Hepes Buffered Saline ») (Invitrogen) tout en injectant de l'air avec une autre pipette. Après une incubation de 30 min à 21°C, le mélange a été distribué sur les cellules aux goutte-à-goutte. 16h plus tard, le milieu a été remplacé par 8 ml de milieu frais. Après 24h, les surnageants contenant les VHCpp ont été recueillis, filtrés à 0,45 µm et congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **9.2 Extraction et concentration des IgG**

Les IgG ont été extraits du sérum des patientes et concentrés comme décrit précédemment.

### **9.3 Infection des Huh 7.5**

Une plaque 96 puits à fond plat (Perkin Elmer, Waltham, É-U) a été recouverte de 100 µl de poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) pendant 1h. La veille de l'infection,  $1 \times 10^4$  cellules Huh 7.5 par puits ont étéensemencées.

La journée de l'infection, 0,5 µg d'AC extraits de sérum de patientes infectées ou 0,025 µg d'AC contrôle AR3B ont été complétés à 170 µl avec les surnageants de transfection contenant les VHCpp. Le mélange AC-VHCpp a été incubé 1h à 37°C puis distribué sur les cellules Huh 7.5 à raison de 50 µl/puits. Après une incubation de 5h (génotypes 1 et 2) ou 8h (génotypes 3 et 4), le mélange AC-VHCpp a été remplacé par 200 µl de DMEM 10% SVF.

### **9.4 Révélation**

84 h après l'infection, les cellules ont été lavées avec 100 µl de PBS 1x avant d'être lysées dans 30 µl de tampon de lyse (Promega, Madison, É-U) pendant 1h à -80°C, puis 30 min à 37°C. La lecture de l'activité luciférase a été mesurée à l'aide d'un luminomètre Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Calmbacter, Allemagne). Brièvement, 100 µl de buffer luciférase (passive lysis buffer 1x, KPO<sub>4</sub> 1M, MgSO<sub>4</sub> 1M, DTT 1M (Thermo Fisher Scientific) et ATP 100 mM (Sigma-Aldrich) et 50 µl de luciférine (Cedarlane, Burlington, Can) ont été ajoutés dans chaque puits avant la lecture de l'intensité lumineuse.

## **10. Analyse statistique**

### **10.1 Profil de quasiespèce**

Les profils de quasiespèces présentés à l'Annexe 4 ont été effectués par Ariane Larouche comme décrit ailleurs (127). Les patientes de la cohorte ont été stratifiées selon le type d'infection (VHC+, VIH- ou VHC+, VIH+) et selon le profil de diversité de la quasiespèce. La diversité a été calculé par la mesure de l'entropie de Shannon normalisée sur le nombre de variantes présentes dans la quasiespèce selon l'équation suivante :

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

Où H=Indice de Shannon normalisé, N=nombre de variantes,  $P_i$ =proportion relative de chaque variante.

Les taux moyens durant la grossesse de mutations synonymes par sites de mutations synonymes potentiels (dS) et de mutations non-synonymes par sites de mutations non-synonymes potentiels (dN) ont été évaluées par Ariane Larouche afin de déterminer la pression sélective exercée sur HVR1. Un test Z testant l'hypothèse de sélection nulle a été effectué au moyen de la méthode Nei-Gojobori et du facteur de correction de Jukes-Cantor avec le logiciel MEGA 5.2.2. La différence entre dN et dS a été évaluée par la méthode « bootstrap » sur ce même logiciel (128, 129).

## 10.2 Tests statistiques

Le test de corrélation de Spearman a été utilisé pour tester les associations entre les données cliniques et expérimentales. Les différences significatives entre différents groupes ont été calculées par des tests U de Mann-Whitney, par des tests de Kruskal-Wallis ou par des tests de contingence au moyen du test exact de Fisher. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism version 6.00 pour Windows (GraphPad Software, La Jolla, É-U).

## Résultats

### 1. Production et titrage de l'AC primaire H53

Dans le but de suivre l'expression des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 dans les lignées cellulaires infectées avec un vecteur d'expression de ces protéines, un AC primaire murin anti-E2, nommé H53, a été produit et purifié à partir de l'hybridome du même nom (126). Afin de déterminer la concentration optimale de H53 à utiliser, cet AC a été titré sur des cellules HEK 293T produisant des VHCpp à des concentrations allant de 0,0025 mg/ml à 0,04 mg/ml. On observe que la fréquence de cellules positives pour E1E2 augmente avec la concentration de H53 jusqu'à atteindre un sommet à 0,03 mg/ml, à la suite duquel cette fréquence diminue légèrement (Fig. 8C). Cette concentration d'anticorps H53 a été utilisée subséquemment dans les marquages intracellulaires et de surface visant à déterminer la présence de la protéine E2.

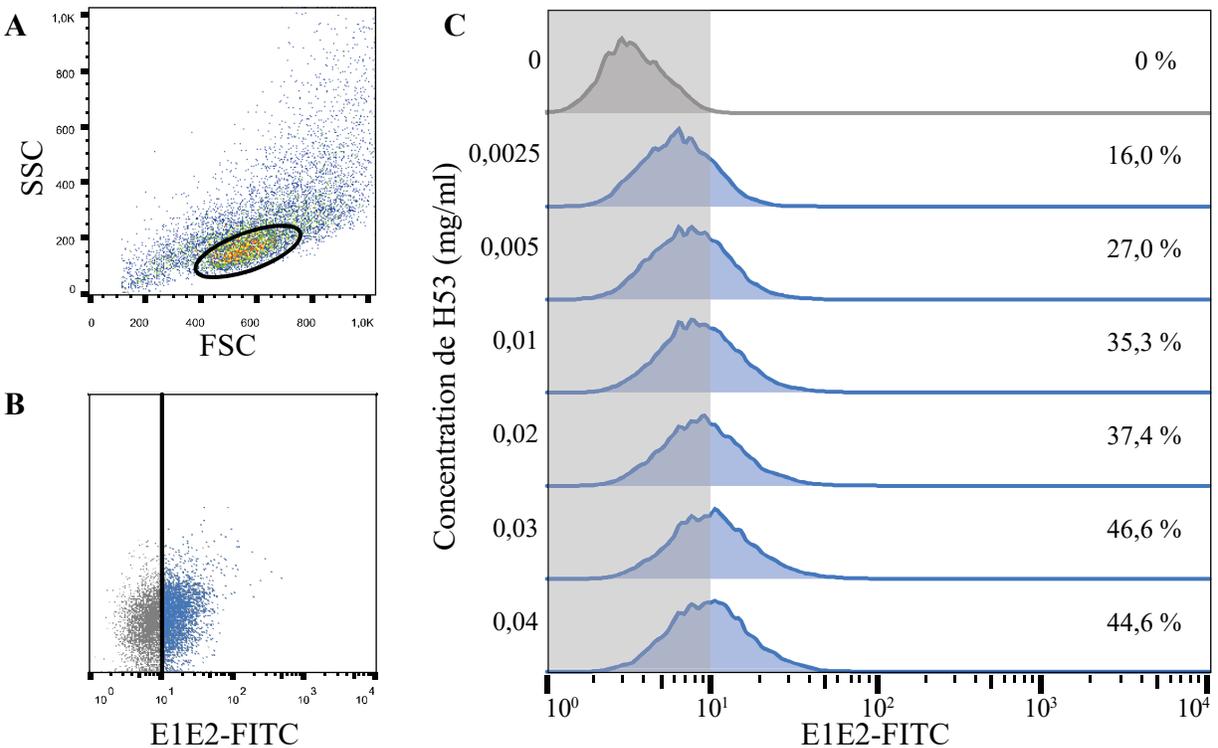


Figure 8. Titrage de l'AC primaire anti-E1E2 H53 sur des cellules HEK 293T produisant des VHCpp

Les cellules HEK 293T mortes et les doublets ont été exclus par l'étude du profil FSC/SSC (« Forward-scattered light » / « Side-scattered light ») (A). Le profil d'expression à la surface

cellulaire du dimère E1E2 est présenté par l'intensité de fluorescence du fluorochrome FITC en abscisse en (B) et (C). Le profil de fluorescence des cellules HEK 293T en présence de 0,03 mg/ml de H53 est présenté en (B). La fréquence de cellules positives pour E1E2-FITC est représentée en (C) en fonction de la concentration de l'AC primaire H53. La zone grise définit les cellules considérées comme négatives pour E1E2.

## **2. Production des cellules cibles CEM-NK<sup>R</sup> exprimant E1E2 à leur surface pour l'essai d'ADCC**

### **2.1 Infection de différentes lignées cellulaires avec des lentivirus codant pour E1E2**

Le système de recombinaison génétique Gateway a été utilisé afin de produire différents vecteurs d'expression d'E1E2 qui se distinguent par le promoteur et le gène de résistance contenus dans la séquence du vecteur (Annexe 3). L'infection avec des particules lentivirales contenant un vecteur d'expression d'E1E2 a permis l'intégration stable du gène d'intérêt dans les lignées cellulaires ciblées. L'expression intracellulaire et de surface d'E1E2 obtenue suite à l'infection de différentes lignées cellulaires par le surnageant de culture contenant les lentivirus a été mesurée par cytométrie en flux une semaine ou plus après avoir ajouté les agents de sélection (Fig. 9).

Le premier vecteur d'expression qui a été utilisé était le vecteur 670-E1E2 qui exprime les glycoprotéines d'enveloppe du VHC sous le contrôle du promoteur CMV (cytomégalovirus) et qui code pour le gène de résistance à la puromycine. L'utilisation de ce vecteur a permis l'expression des protéines d'intérêt dans le tiers des cellules HEK 293T et Huh 7.5, aussi bien au niveau intracellulaire qu'à la surface de la cellule (Fig. 9A). Cependant, il est nécessaire de rappeler que l'on cherche à obtenir E1E2 à la surface des cellules CEM-NK<sup>R</sup> qui serviront pour l'essai d'ADCC. De ce côté, le vecteur 670-E1E2 ne permet pas l'expression d'E1E2 dans les cellules CEM-NK<sup>R</sup> comme on peut le constater à la Figure 9. Néanmoins, l'expression des protéines d'intérêts dans les cellules HEK 293T et Huh 7.5 témoigne de l'efficacité du vecteur 670-E1E2. Il faut mentionner ici que l'efficacité d'infection a été vérifiée par l'utilisation d'un vecteur GFP (Annexe 2) en cytométrie en flux (résultats non-présentés).

Toujours dans l'optique d'obtenir l'expression d'E1E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup>, la réaction de la clonase LR du système Gateway a été exploitée pour recombiner le gène E1E2 dans un

nouveau vecteur d'expression, le vecteur 529-E1E2. Nous avons voulu testé si un changement de promoteur aurait un impact sur l'expression d'E1E2 dans les CEM-NK<sup>R</sup>. L'expression d'E1E2 dans ce vecteur est sous le contrôle du promoteur PGK (phosphoglycérate kinase) et est également sélectionnée dans les cellules infectées par l'utilisation de puromycine. Comme illustré à la Figure 9 B, l'intégration stable de ce vecteur d'expression permet cette fois-ci l'expression limitée d'E1E2 aux compartiments intracellulaires dans les cellules CEM-NK<sup>R</sup>. Malgré un taux d'expression intracellulaire de 64% dans les cellules, aucune expression d'E1E2 à la surface des cellules CEM-NK<sup>R</sup> n'est observable. De plus, le vecteur 529-E1E2 a également permis une expression intracellulaire et de surface robuste dans les HEK 293T et Huh 7.5 (résultats non-présentés).

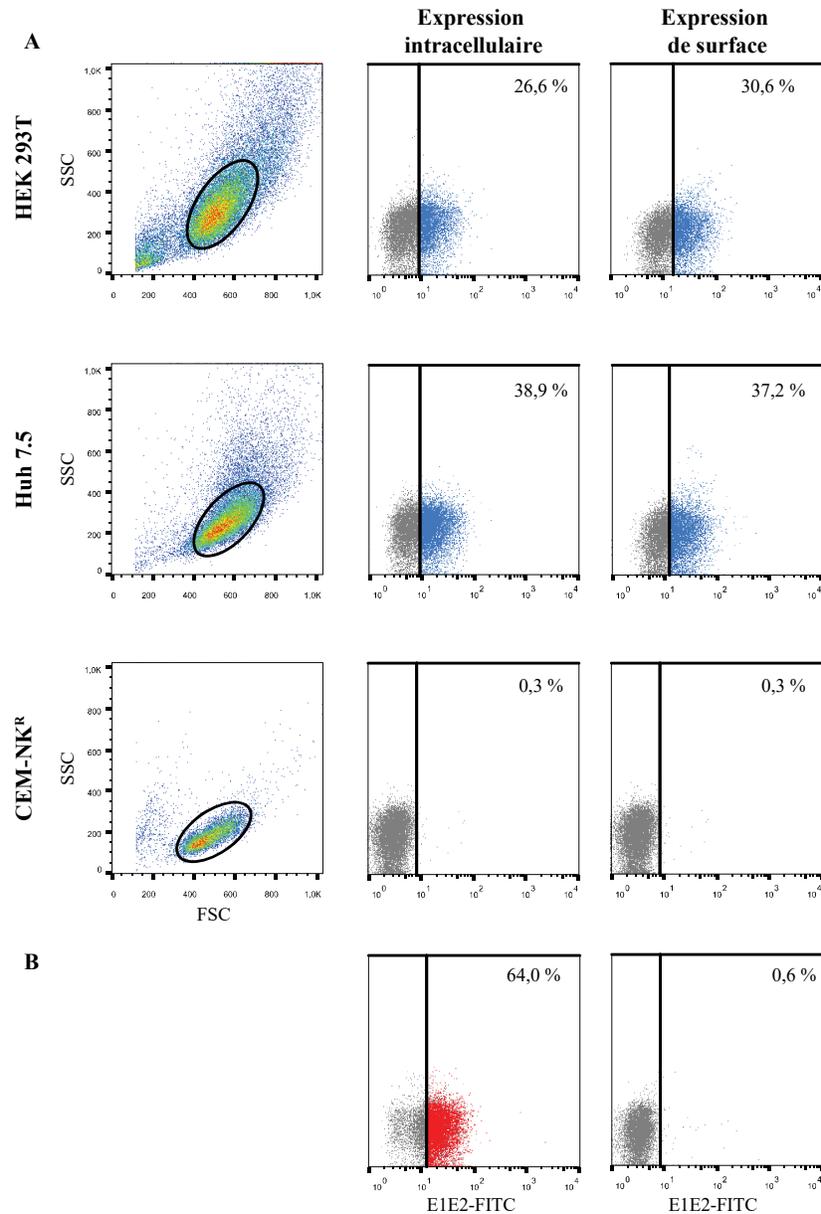


Figure 9. Expression intracellulaire et de surface d'E1E2 dans les lignées cellulaires HEK 293T, Huh 7.5 et CEM-NK<sup>R</sup>

Pour chaque type de cellules utilisées, les cellules mortes et les doublets ont été exclus par l'étude du profil FSC/SSC. Les deuxièmes et troisièmes colonnes représentent respectivement les profils d'expression intracellulaire et de surface d'E1E2. La proportion des cellules positives pour l'expression d'E1E2 est indiquée dans le coin supérieur droit de chacun des cadrans et est dépeinte en bleu pour le vecteur 670-E1E2 (A) et en rouge pour le vecteur 529-E1E2 (B). Les protéines E1E2 sont présentes intracellulairement et à la surface dans les cellules HEK 293T et Huh 7.5. Elles sont uniquement exprimées intracellulairement dans les cellules CEM-NK<sup>R</sup> avec le vecteur 529-E1E2.

## 2.2 Développement d'une lignée CEM-NK<sup>R</sup> déficiente pour CD81

Une hypothèse a été émise afin d'expliquer pourquoi l'expression d'E1E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup> n'est pas atteinte. Celle-ci stipule que l'interaction dans les compartiments intracellulaires d'E1E2 avec CD81, le récepteur primaire du VHC, entraverait la migration d'E1E2 à la surface (130). C'est pourquoi une lignée de CEM-NK<sup>R</sup> déficiente pour le gène CD81 a été élaborée à l'aide du système d'édition génique CRISPR-Cas9.

Dans un premier temps, un système basé sur la transfection d'ARNg et de la protéine Cas9 dans les cellules cibles a été utilisé (Fig. 10). Puisque les CEM-NK<sup>R</sup> sont des cellules en suspension difficiles à transfecter, l'édition génique par CRISPR-Cas9 a préalablement été testée sur des cellules HEK 293T en utilisant la lipofectamine comme agent de transfection. Dans ce modèle, une diminution de l'expression de CD81 a été observée pour les deux mélanges utilisés. Ces derniers contiennent des combinaisons différentes de deux ARNg ciblant le gène CD81 (Fig. 10A). Le mélange 2 (ARNg 2 et 6) a permis l'obtention de 8,1% de cellules HEK 293T négatives pour CD81. Plus d'une centaine de clones de cet échantillon ont été isolés par la technique de dilution limite afin d'obtenir une lignée pure n'exprimant pas CD81. Malheureusement, le résultat du marquage de CD81 des clones isolés n'a pas donné les résultats escomptés, tous exprimaient CD81 (résultats non-présentés).

Néanmoins, le mélange 2 a été utilisé pour transfecter des cellules CEM-NK<sup>R</sup> par électroporation. Les paramètres d'électroporation optimaux pour la lignée CEM-NK<sup>R</sup> ont préalablement été établis au moyen d'un vecteur ADN codant pour la GFP. Ainsi, un choc électrique de 220 V a été utilisé pour électroporer  $1 \times 10^6$  cellules dans du milieu opti-MEM. Aucun effet sur l'expression de CD81 n'a été observé suite à cette expérience, malgré que l'efficacité de l'électroporation ait été contrôlée par la transfection d'un vecteur GFP (Fig. 10B).

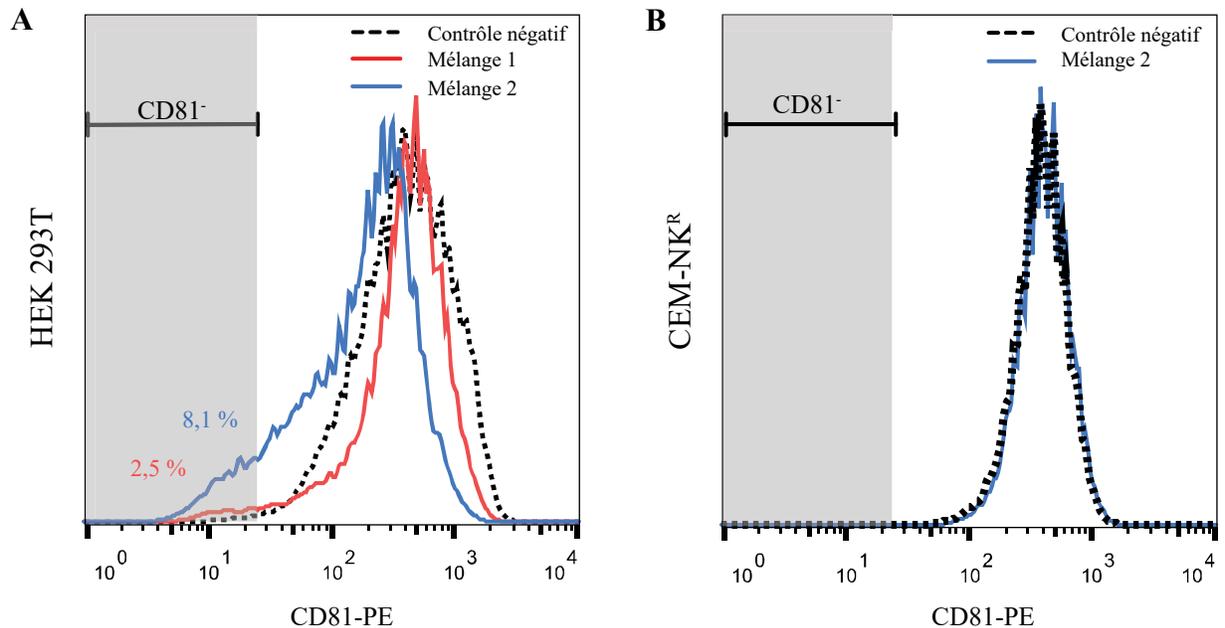


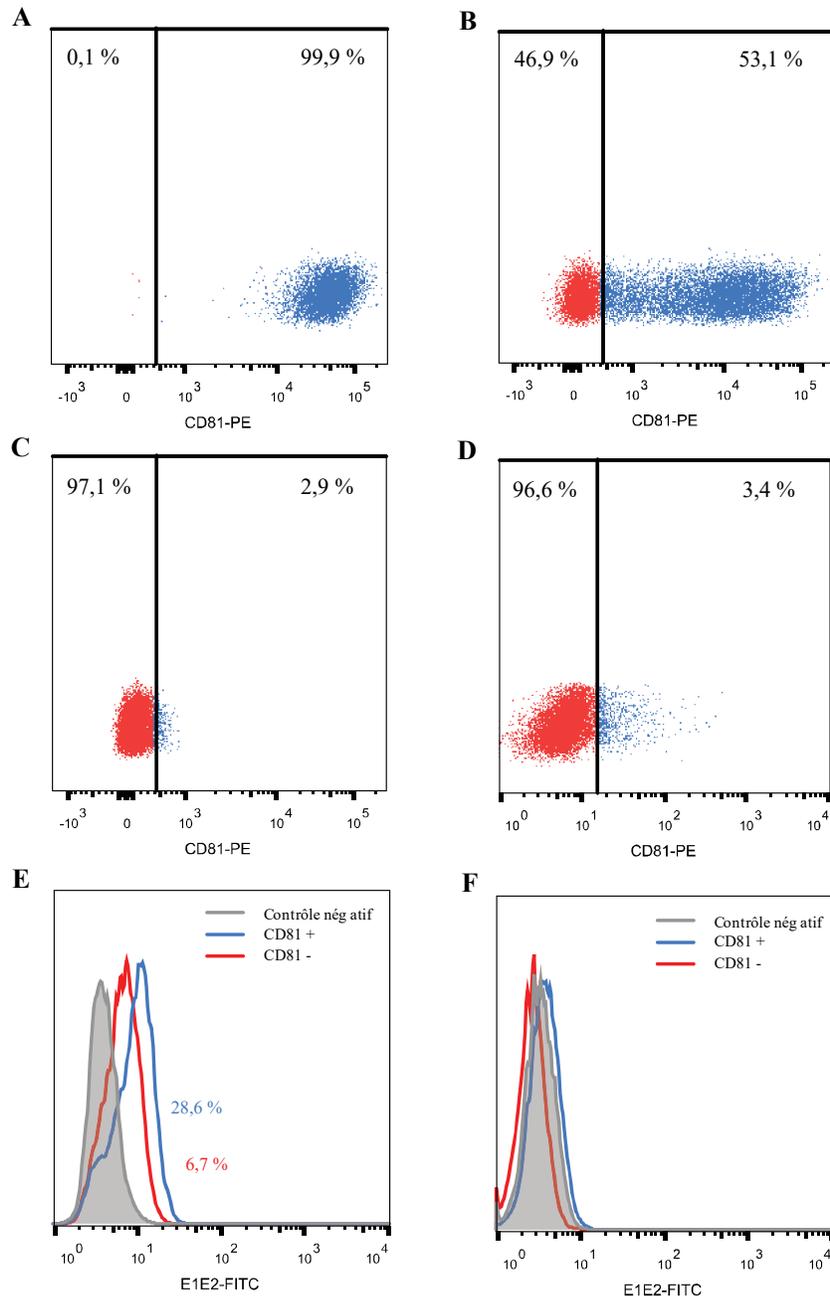
Figure 10. Efficacité du système CRISPR-Cas9 basé sur la transfection d'ARNg et de la nucléase Cas9 dans les cellules HEK 293T et CEM-NK<sup>R</sup>

Une diminution de l'expression de CD81 est visible dans les HEK 293T. Celle-ci est plus importante lorsque le mélange 2 est utilisée : 8,1% de la population est négative (A). Aucune diminution de l'expression de CD81 n'a été observée dans les CEM-NK<sup>R</sup> (B).

Dans un second temps, un autre système CRISPR-Cas9 a été testé lors d'une collaboration avec le Dr Christian Beauséjour (Centre de recherche du CHU Sainte-Justine). Ce système est basé sur l'expression stable de la nucléase Cas9 et des ARNg par l'utilisation de vecteurs lentiviraux. Ce changement de méthode s'est avéré fructueux puisque 12% de cellules négatives pour CD81 ont été obtenues dans la meilleure condition (Annexe 4). Cette fréquence a continué de s'accroître dans les semaines suivantes pour atteindre 46,9% (Fig. 11B). L'expression stable de Cas9 et des ARNg ainsi que l'utilisation de deux agents de sélection (puromycine et blasticidine) a vraisemblablement permis d'augmenter l'effet de l'édition génique au cours de cette période. Par la suite, les cellules négatives pour CD81 ont été triées à la plateforme de cytométrie de l'Université de Montréal. Une pureté de 97,1 % a été obtenue et s'est maintenue pendant au moins deux mois (96,6%), même sans utiliser d'agents de sélection (Fig.11C et D).

### **2.3 Infection d'une lignée CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> avec des lentivirus codant pour E1E2**

Afin de tester l'hypothèse que l'interaction entre CD81 et E1E2 entrave la migration de cette dernière à la surface, un nouveau vecteur lentiviral codant pour E1E2 a été construit par la réaction de la clonase LR comme décrit précédemment. Tout comme le vecteur 529-E1E2, le nouveau vecteur 530-E1E2 est sous le contrôle du promoteur PGK. Il a été nécessaire de changer de vecteur, car l'utilisation de la puromycine comme agent de sélection avec le vecteur 529-E1E2 entrainait en conflit avec les agents de sélections utilisés dans le système CRISPR-Cas9 (puromycine et blasticidine). C'est pourquoi le vecteur 530-E1E2, qui code pour le gène de résistance à l'hygromycine B, a été sélectionné. Les résultats de l'infection des CEM-NK<sup>R</sup> et CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> avec les lentivirus 530-E1E2 sont présentés à la Figure 11. Par le marquage intracellulaire, on remarque une MFI et un nombre de cellules positives plus élevés dans les CEM-NK<sup>R</sup> que dans leur homologue n'exprimant pas CD81. En effet, la MFI est environ deux fois plus élevée dans les CEM-NK<sup>R</sup> que dans les CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> et il y a 4,3 fois plus de cellules positives pour E1E2 dans les premières (Fig. 11E). Il est aussi intéressant de remarquer qu'il n'y a pas d'expression d'E1E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup> avec ou sans expression de CD81 (Fig. 11F).



**Figure 11.** Obtention d'une lignée CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> et expression d'E1E2

L'expression de CD81 dans des cellules CEM-NK<sup>R</sup> non-modifiées (A) et dans des cellules CEM-NK<sup>R</sup> modifiées par le système CRISPR-Cas9 (B) est illustrée ci-dessus. La pureté de la lignée CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> la journée même du tri (C) ou 2 mois après tri (D) est de plus de 95%. Finalement, l'expression intracellulaire (E) et de surface (F) d'E1E2 (vecteur 530-E1E2) est représentée par le nombre de cellules positives pour E1E2 dans les lignées CEM-NK<sup>R</sup> et dans CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup>. La MFI nette ( $MFI_{\text{échantillon}} - MFI_{\text{contrôle négatif}}$ ) est de 5,7 unités pour les CEM-NK<sup>R</sup> et 2,9 unités pour les CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup>.

## 2.4 Liaison d'E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup>

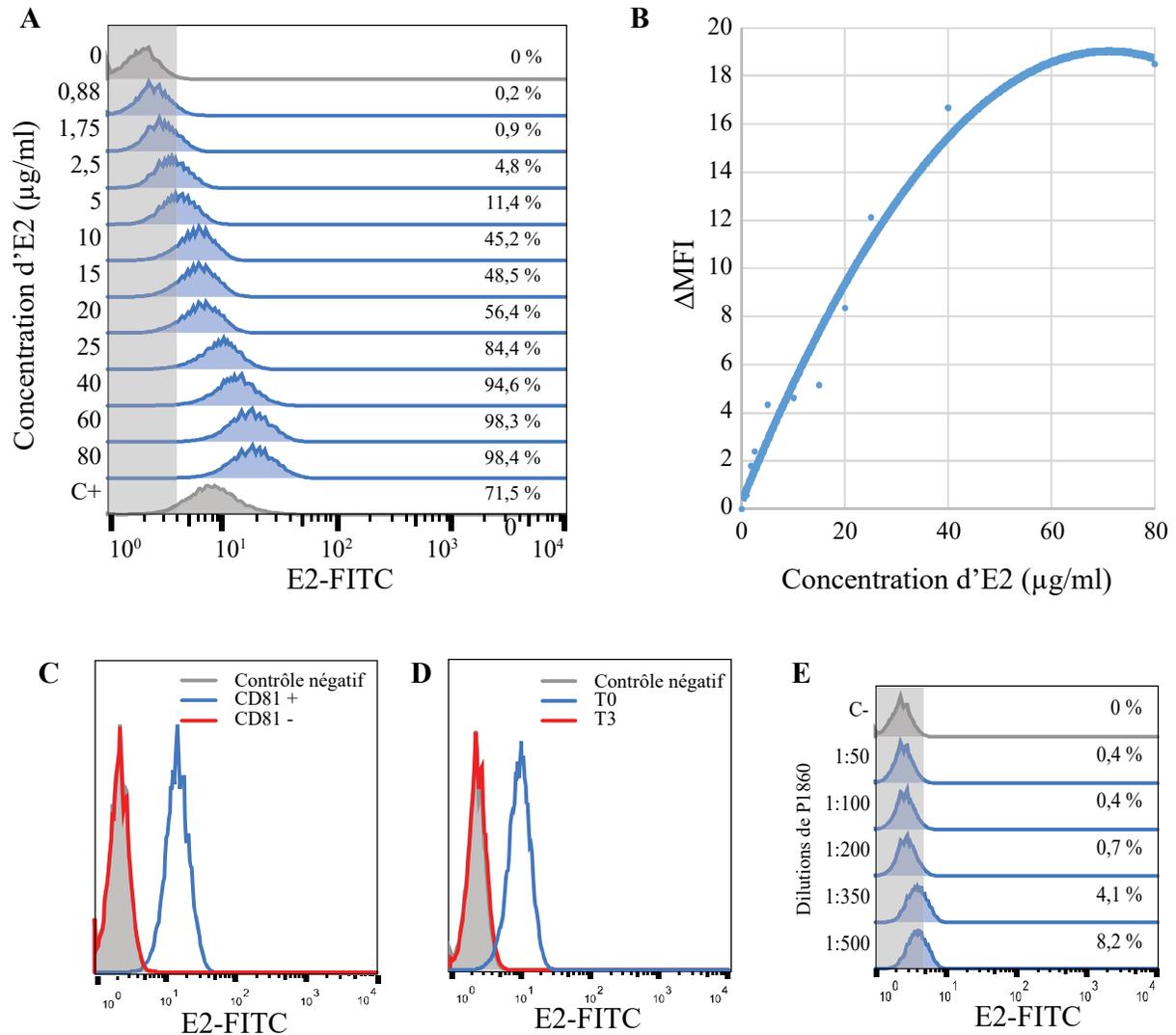
Puisque les méthodes utilisées précédemment n'ont pas permis l'obtention d'une lignée CEM-NK<sup>R</sup> exprimant E1E2 à leur surface, il a été décidé d'utiliser une forme soluble de la protéine E2 dont la liaison à la surface des CEM-NK<sup>R</sup> pourrait permettre de diriger la réponse ADCC (96). En effet, il n'est malheureusement pas possible à ce jour de produire un dimère E1E2 soluble, car le domaine responsable de la dimérisation de ces protéines possède un signal de rétention au RE (20). Il faudra donc considérer que ce système est moins optimal puisqu'il ne permettra pas de déceler la présence d'AC anti-E1 pouvant diriger l'ADCC dans le sérum des patientes infectées.

Afin de déterminer quelle concentration de la protéine E2 utiliser dans un essai d'ADCC, une courbe de titrage a été effectuée grâce à un marquage de surface quantifiant la liaison de la protéine E2 à la surface des cellules CEM-NK<sup>R</sup>. On y remarque que la quantité d'E2 liée augmente avec la concentration de protéine utilisée et semble atteindre un plateau à 70 µg/ml d'E2. À ce niveau, presque toute la population de cellules CEM-NK<sup>R</sup> lie E2 à sa surface (environ 98%) à une MFI nette de 19 unités. Néanmoins, par souci d'économie, une concentration de 25 µg/ml a été sélectionnée pour la suite des expérimentations. À cette concentration, la MFI et le pourcentage de cellules positives sont légèrement supérieurs à ceux du contrôle positif, soit des cellules HEK 293T productrice de VHCpp (Fig. 12A et B).

En théorie, E2 devrait se lier spécifiquement à CD81 à la surface des cellules CEM-NK<sup>R</sup>. Pour vérifier la spécificité de cette liaison, la lignée CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> a été incubée avec la protéine E2 soluble. Le marquage subséquent effectué a révélé un patron de fluorescence identique à celui du contrôle négatif qui n'avait pas été incubé avec la protéine soluble (Fig. 12C).

De plus, la stabilité de la liaison d'E2 a également été testée. On remarque à la Figure 12 D, qu'il ne reste plus de protéine E2 liée après une incubation de 3h. Pour expliquer ce phénomène, deux hypothèses ont été proposées. Dans un premier temps, il serait possible que la protéine E2 soit internalisée au cours de l'incubation. Pour tester cette hypothèse, un marquage intracellulaire a été effectué après 3h d'incubation : celui-ci n'a pas révélé la présence d'E2 dans les compartiments intracellulaires (résultats non-présentés). Dans un second temps, il a été envisagé que la protéine E2 puisse être dégradée. Pour vérifier cette hypothèse, un mélange

d'inhibiteurs de protéases, le P1860, a été ajouté au début de l'incubation et/ou à chaque 30 minutes suivant le début de l'incubation. Cependant, il s'est avéré que l'ajout répété ou l'ajout de plus hautes concentrations de P1860 était toxique pour les cellules, probablement puisqu'il est dilué dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) (résultats non-présentés). Néanmoins, il a été possible de constater que l'expression d'E2 était en partie récupérée après 3h d'incubation par l'ajout de P1860 (Fig. 12E).



**Figure 12. Liaison d'E2 à la surface des CEM-NKR : titrage, spécificité et durée de la liaison**

La liaison d'E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup> a été vérifiée par cytométrie en flux à différentes concentrations (A, B). Cette liaison a été évaluée par la MFI nette (B) et par la fréquence de cellules positives pour E2 (A). Cette liaison est spécifique à CD81, comme démontré par l'absence de liaison à la surface des CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> (CD81<sup>-</sup>) (C). La présence d'E2 à la

surface des cellules étudiées est observable directement après la liaison (T0), mais pas après 3h d'incubation (T3) (D). Par contre, la liaison est partiellement récupérée après 3h d'incubation par l'ajout de P1860, un cocktail d'inhibiteurs de protéase (E).

### 3. Élaboration de l'essai d'ADCC

Lors du premier essai présenté à la Figure 14 B, différents AC monoclonaux et sera ont été testés pour leur capacité à diriger la réponse ADCC : différentes IgG sous différentes formes ont été testées. En premier lieu, l'AC AR3B et l'AC H53 sont respectivement des IgG monoclonaux humains et murins reconnaissant la glycoprotéine E2 du VHC (80, 126). En deuxième lieu, le sérum VHC+ provient de la patiente TVC181, qui possède un profil de neutralisation diversifié contre plusieurs variantes autologues de VHCpp (Annexe 5). Ce sérum a été sélectionné selon le raisonnement que si la diversité des épitopes reconnus était plus importante, il serait probable que certains de ces IgG dirigent l'ADCC. En dernier lieu, le sérum d'un individu sain a également été testé en guise de contrôle négatif. L'activité des IgG a été étudiée soit directement par l'ajout de sérum décomplémenté, soit par des IgG extraits du sérum. De plus, des cellules CEM-NK<sup>R</sup> n'ayant pas été incubées avec la protéine E2 soluble ont été étudiées parallèlement.

Le pourcentage d'ADCC a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\% ADCC = \frac{(C + E) - (C + E + IgG)}{C} \times 100$$

Où (C+E) représente le nombre de cellules cibles viables (C) en présence de cellules effectrices (E) uniquement, où (C+E+IgG) représente le nombre de cellules cibles viables en présence de cellules effectrices et d'IgG et où C représente le nombre de cellules cibles viables seules. Il est à noter que le compte de cellules cibles a été normalisé en se basant sur le nombre de particules « Accucount ».

Ainsi, si on analyse le graphique à la Figure 13 B, on remarque premièrement que l'activité ADCC pour les contrôles négatifs, soit les CEM-NK<sup>R</sup> et l'individu VHC -, est élevée et varie entre 10 et 23%. De plus, l'extraction des IgG à partir du sérum n'a pas permis de réduire ce bruit de fond, puisque les niveaux d'activité ADCC sont comparables à ceux obtenus avec le sérum décomplémenté. En bref, il n'y a pas de différences significatives entre les contrôles négatifs (barres gris foncé) et les échantillons testés (barres gris pâle), sauf pour l'AC monoclonal H53. Les causes de ce bruit de fond seront abordées dans la discussion.

Cependant, il est important d'indiquer que différents ratios de cellules cibles et cellules effectrices ont été subséquemment testés afin de déterminer si l'activité d'ADCC observée était réelle (Fig. 13 C). On s'attendrait à voir une augmentation de l'activité ADCC lorsque plus de cellules effectrices ont été ajoutées. Dans l'essai suivant effectué avec le sérum de la patiente TVC181, on remarque premièrement que l'activité ADCC augmente légèrement lorsque plus de cellules effectrices sont présentes pour atteindre un taux maximal de 5%. Le deuxième point important à réaliser est que des modifications techniques au protocole, qui seront également discutées dans la discussion, ont permis de réduire le bruit de fond dans cet essai ADCC.

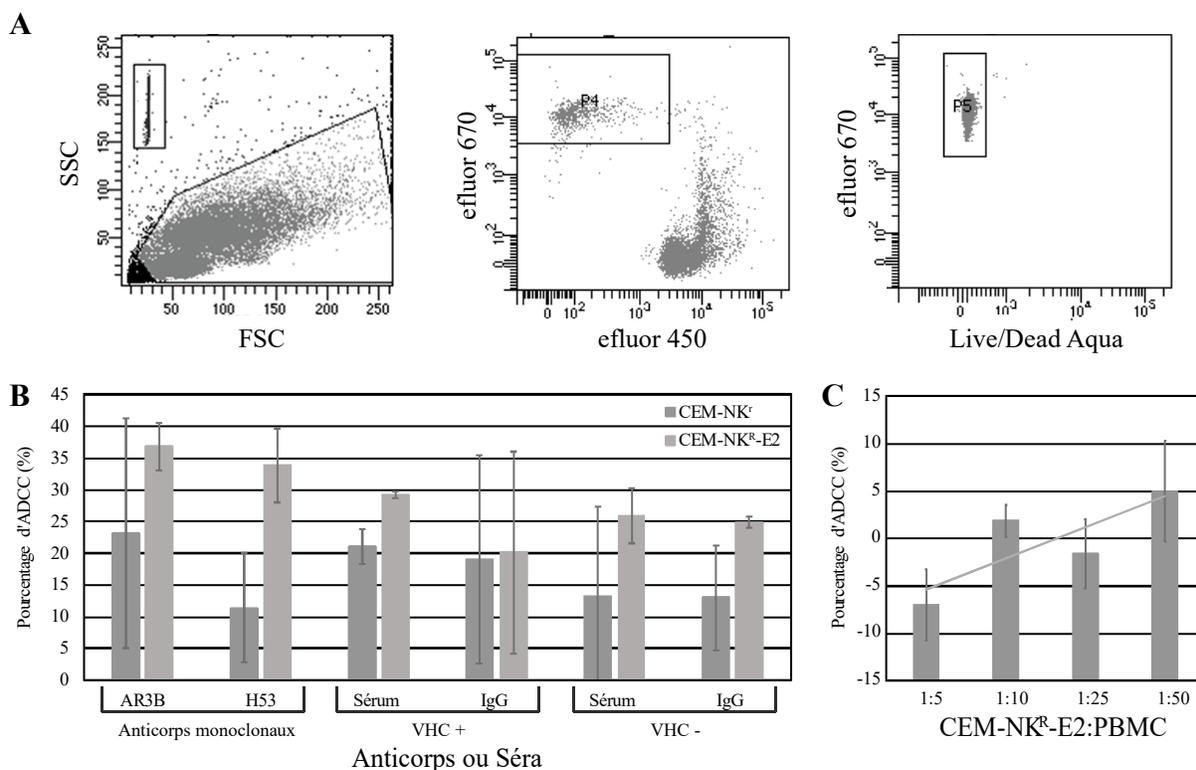


Figure 13. Élaboration d'un essai d'ADCC

Stratégie pour isoler les cellules cibles en cytométrie en flux : les lymphocytes ont été sélectionnés par leur profil FSC/SSC et les doublets ont été exclus (résultats non-présentés) (A). Les cellules cibles marquées avec le fluorochrome eFluor 670 ont ensuite été délimitées (A). Le marqueur eFluor 450 a été utilisé pour suivre les cellules effectrices. Le compte de cellules cibles a été établi grâce au marqueur de viabilité et normalisé sur le nombre de billes « Accucount » que l'on peut observer dans le coin supérieur gauche du premier cadran. Le pourcentage d'ADCC dans différentes conditions est présenté en (B et C). Un pourcentage d'ADCC négatif représente ici une situation où le nombre de cellules cibles viables est supérieur en présence

d'IgG qu'en leur absence. Les données ont été calculées à partir d'un duplicata de chaque condition. Les barres d'erreur représentent l'écart type de chaque duplicata.

#### 4. Essais de neutralisation

L'infectivité des VHCpp de différents génotypes en présence d'AC extraits des sera des patientes ou d'AC extraits de sera contrôles a été déterminée grâce à l'étude de l'intensité lumineuse relative (ILR) induite par la luciférase. Il est à noter que les patientes infectées par un VHC de génotype 3 (120, 143, 52, TVC45, TVC73 et TVC33) ont été exclues des essais de neutralisation, car la VHCpp de référence (3a 1.28) n'infectait pas de manière satisfaisante (Fig.14).

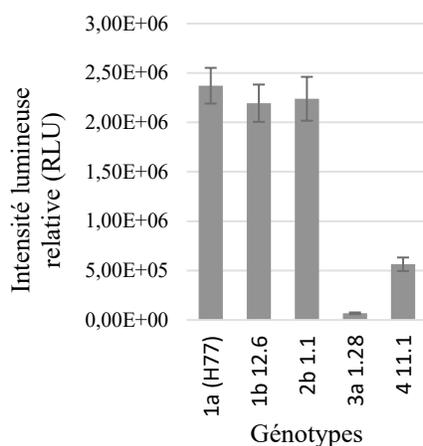


Figure 14. Infectivité des VHCpp de références

La formule suivante a permis d'établir le pourcentage de neutralisation induit par ces sérums :

$$\text{Pourcentage de neutralisation (\%)}: 100 - \left( \frac{ILR_{\text{échantillon}}}{ILR_{\text{sérum contrôle}}} * 100 \right)$$

Il est utile de mentionner que le seuil de neutralisation a été fixé arbitrairement à 50% et que l'activité neutralisante d'un AC monoclonal à large spectre (AR3B) a été vérifiée pour tous les génotypes de VHCpp utilisés. De plus, certaines patientes de la cohorte ont été suivies lors de grossesses consécutives qui sont identifiables par les lettres adjacentes à l'identifiant de la patiente. Celles-ci sont disposées chronologiquement dans la Figure 15A et B. On peut remarquer que l'activité neutralisante tend à augmenter au fil de ces grossesses consécutives. Cet effet est particulièrement marqué chez la patiente TVC79 (Fig.16, A) qui ne présente pas d'activité neutralisante à sa première grossesse, alors qu'elle neutralise les VHCpp à environ

80% lors de sa deuxième grossesse. Il est intéressant de noter que la quasiespèce du VHC chez la patiente TVC79 s'est largement diversifiée entre la première (Indice de Shannon normalisé moyen -ISNM- = 0,012) et la deuxième grossesse (ISNM = 0,590) (Annexe 5). L'augmentation de l'activité neutralisante au fil des grossesses est également observable dans une moindre mesure chez les patientes co-infectées TVC43, TV247, TV233, TVC17 et TV179. La seule patiente qui échappe à cette tendance est la TVC189, une femme mono-infectée par le VHC, qui n'a pas montré de neutralisation significative des VHCpp au cours de ses deux grossesses.

Les patientes mono-infectées TVC79 et TVC189 ont toutes deux transmis le VHC à leur enfant lors de la première grossesse, alors que l'activité neutralisante était nulle, mais pas lors de la deuxième grossesse où l'activité neutralisante était élevée, du moins dans le cas de la TVC79. Ce patron n'est pas reproduit chez les patientes co-infectées : les deux seules incidences de TME ont pris place chez des patientes de haute diversité (HD) présentant un profil de neutralisation de plus de 70%, soit les patientes TVC55 et TV233b.

Les patientes marquées par un astérisque à la Figure 15, soit TVC79a, TVC189a, TVC189b, 16, TV247a, TV179a, TV179b, TV075 et TVC59, sont des patientes présentant un profil de quasiespèce de faible diversité (FD) monovariante (Annexe 5). Elles sont caractérisées par la présence d'une variante unique représentant plus de 80% de la quasiespèce, et ce, de manière stable au cours de tous les échantillons. À l'exception de la patiente 15, toutes ces femmes de profil monovariante avaient une activité neutralisante en dessous du seuil de 50%.

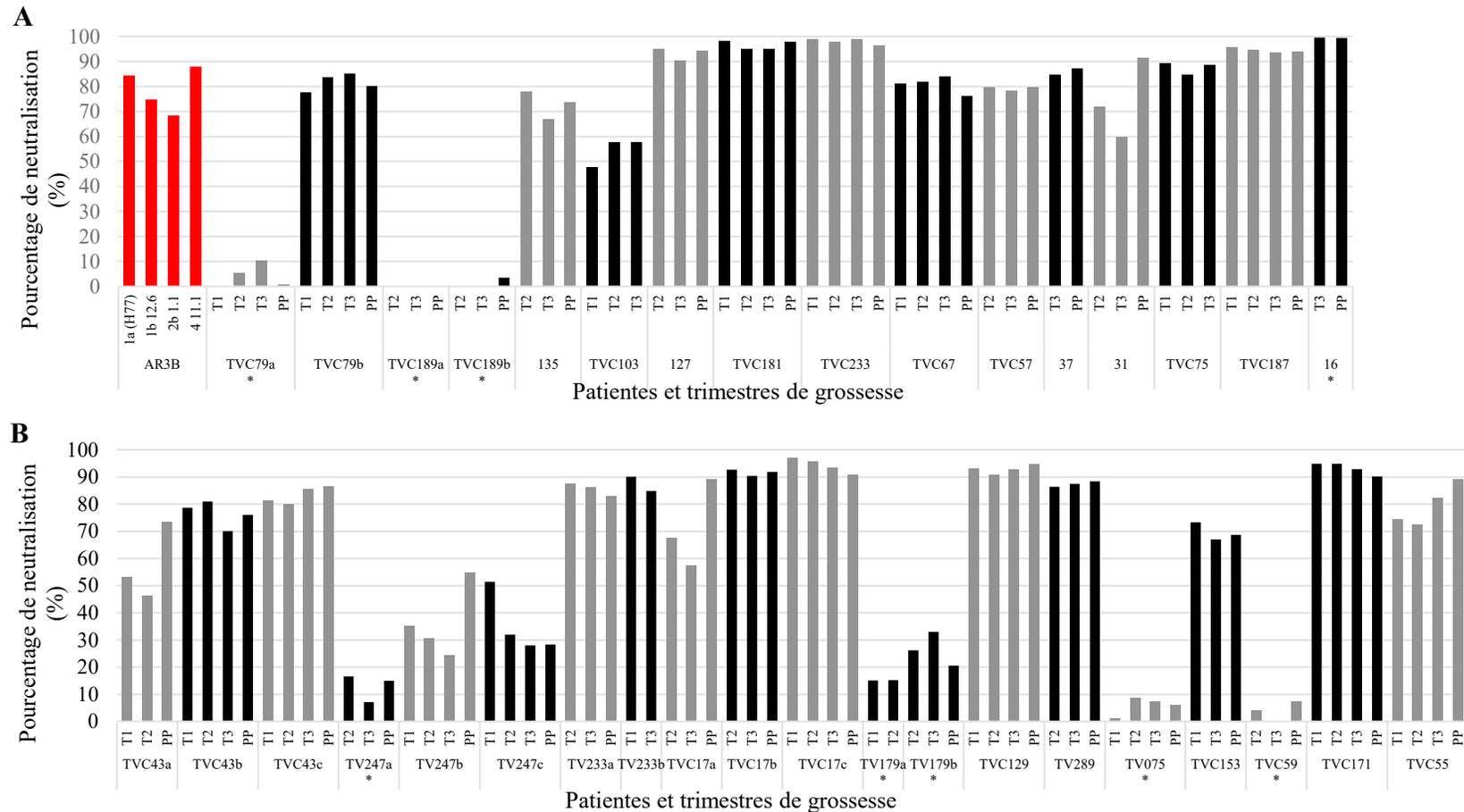


Figure 15. Pourcentage de neutralisation aux différents trimestres de grossesse

La neutralisation des IgG extraites du sérum des patientes mono-infectées (A) et co-infectées (B) est représentée par le pourcentage de neutralisation des VHCcps de référence. Les pourcentages de neutralisation de l'AC contrôle AR3B sont dépeintes en rouge. Les grossesses consécutives sont indiquées par les lettres adjacentes à l'identifiant de la patiente et sont disposées en ordre chronologique. Les patientes marquées d'un astérisque présentent un profil monovariant de la quasiespèce du VHC.

## 5. Analyse statistique des essais de neutralisation

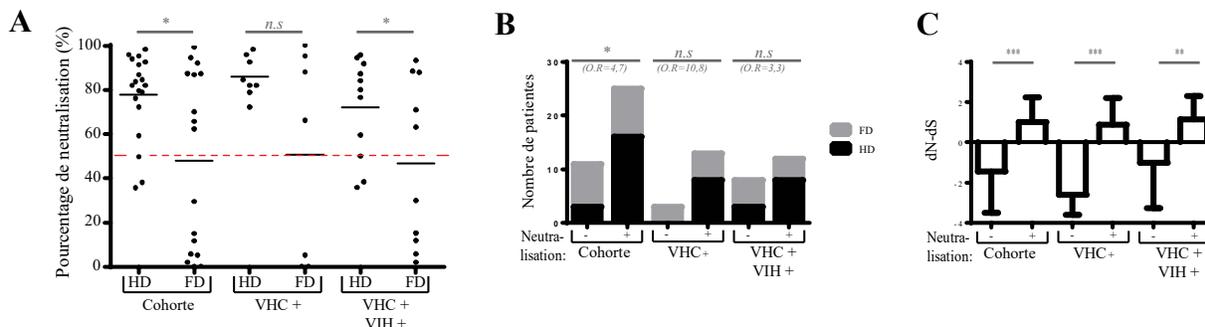
Les taux de neutralisation établis plus haut sont centraux aux différentes analyses statistiques présentées dans la prochaine section. Les variations dans l'activité neutralisante, ainsi que dans la diversité de la quasiespèce, dans la virémie du VHC et dans les niveaux de marqueurs d'inflammation hépatique entre les différents trimestres de grossesse ont été analysées avec le test de Kruskal-Wallis. Cette analyse a démontré qu'il n'y a pas de variation significative pour ces variables entre les différents trimestres de grossesse. Ainsi, les valeurs moyennes lors de la grossesse ont été utilisées pour les analyses suivantes.

### 5.1 Neutralisation et diversité

Afin de déterminer l'implication de la réponse humorale neutralisante sur l'évolution virale au sein de son hôte, l'interaction entre pourcentage de neutralisation et évolution de la quasiespèce a été établie. En effet, il existe une corrélation positive entre l'augmentation de la diversité de la quasiespèce, évaluée avec l'ISNM, et la force de la réponse neutralisante au sein de la cohorte ( $p=0,0095$ , Test de corrélation de Spearman). L'activité neutralisante des IgG extraites du sérum des patientes est plus élevée chez les patientes HD que les patientes FD. Cette association est significative pour la cohorte et pour les patientes co-infectées, mais une tendance est tout de même observable chez les patientes mono-infectées. Dans ce dernier groupe, toutes les patientes HD ont une activité neutralisante de plus de 50%. Il est également intéressant d'observer que les moyennes de neutralisation des groupes HD sont toujours élevées (Fig. 16A). Présenté différemment, on peut dire que les patientes ayant développé une activité neutralisante ont 4,7 fois plus de chance de présenter une forte diversification de leur quasiespèce ( $p=0,0468$ , Test exact de Fisher) (Fig. 16B).

Puisqu'il est reconnu dans la littérature que la réponse immunitaire exerce une force de pression sélective sur l'évolution d'un pathogène, la relation entre le taux de dN-dS avec le pourcentage de neutralisation et la diversité de la quasiespèce (ISNM) a été établi. Un dN-dS positif dans les régions hypervariables de la glycoprotéine E2 indique la présence d'une pression sélective sur la séquence protéique de cette région exposée (128, 131). Il est ainsi intéressant d'observer une corrélation positive entre le dN-dS et la diversité de la quasiespèce ( $p<0,0001$ , Test de corrélation de Spearman) en plus de la force de la réponse neutralisante ( $p<0,0001$ , Test de

corrélation de Spearman). La Figure 16 C illustre de manière intuitive comment la présence de réponse neutralisante maternelle influence significativement la pression sélective positive exercée sur les séquences HVR1 d'E2.



**Figure 16. Relation entre activité neutralisante, pression sélective et diversité de la quasiespèce**  
 Comparaison entre l'activité neutralisante des patientes ayant une quasiespèce de HD (n=22) et de FD (n=20). Une HD semble être favorisée par une moyenne de neutralisation élevée (A, B). La présence de neutralisation est accompagnée d'un taux de dN-dS positif indiquant une pression sélective. Un seuil de 50% a été établi pour déterminer la présence ou l'absence d'activité neutralisante (C). 25 patientes sont au-dessus de la limite de neutralisation et 11 patientes en dessous. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé en (A) et (C) et le test exact de Fisher en (B).

## 5.2 TME

Au sein de notre groupe à l'étude, 17% des grossesses ont mené à la TME : 5 et 2 occurrences de TME ont respectivement pris place chez des patientes mono-infectées et co-infectées. L'ISNM au cours de la grossesse montre une association significative avec la TME dans la cohorte ( $p=0,0262$ , Test de Mann-Whitney) et chez les patientes mono-infectées ( $p=0,0095$ , Test de Mann-Whitney). En effet, les patientes mono-infectées ayant un profil de quasiespèce hautement diversifié présentent 25,7 fois moins de risque de TME ( $p=0,0108$ , Test exact de Fisher). Pour ce qui est des patientes co-infectées, cette association n'est pas significative et une haute diversité n'influence pas le risque de TME (*n.s.*, OR « Odds Ratio » = 1,1, Test exact de Fisher) (Fig. 17A et B).

Malgré la précédente association entre la diversité de la quasiespèce et les réponses neutralisantes et entre la diversité de la quasiespèce et la TME, aucune association significative n'a été révélée entre le pourcentage de neutralisation et la TME. On peut néanmoins observer

que, chez les patientes mono-infectées, toutes les femmes n'ayant pas transmis le VHC à leur enfant présentent une réponse neutralisante au-dessus du seuil (Fig. 17C). Dans ce cas, on constate que les femmes ayant développé une réponse humorale neutralisante anti-VHC ont 11,1 fois moins de risque de TME que leurs homologues n'étant pas à même de neutraliser le VHC (*n.s.*, Test exact de Fisher) (Fig. 17D). Au contraire, les deux femmes co-infectées qui ont transmis le VHC à leur enfant présentaient une activité de neutralisation élevée (*n.s.*, Test exact de Fisher) (Fig. 17C).

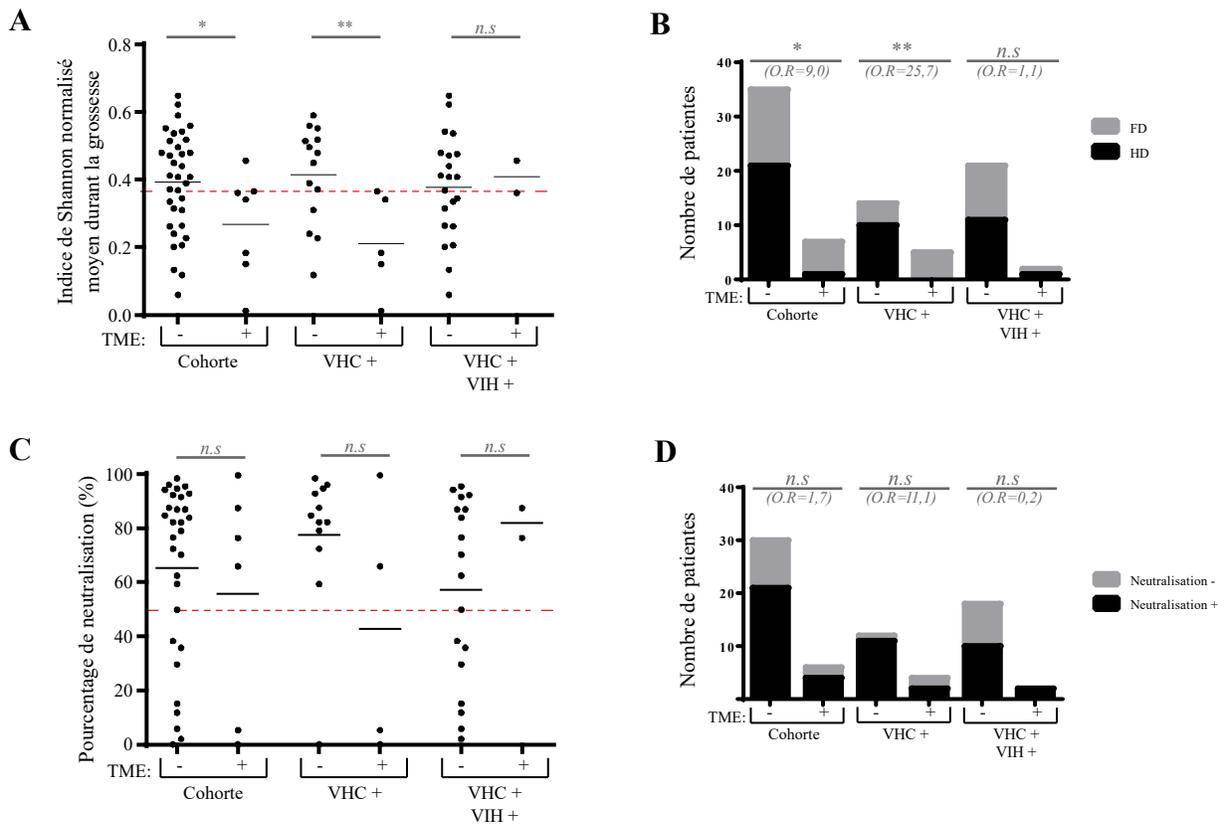


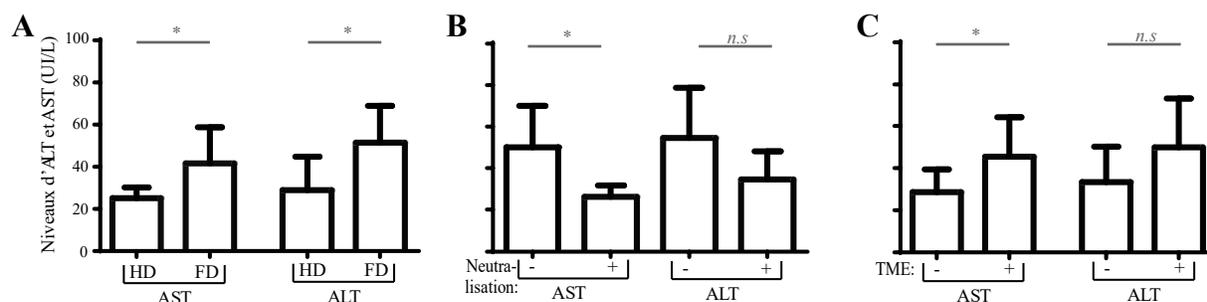
Figure 17. Influence de la diversité de la quasiespèce et de l'activité neutralisante sur la probabilité de TME du VHC

La diversité de la quasiespèce des patientes ayant transmis le VHC est plus faible dans la cohorte entière et chez les patientes mono-infectées uniquement (TME + : n=7; TME - : n=35) (A, B). La moyenne de l'activité neutralisante est plus élevée chez les femmes n'ayant pas transmis le VHC (C, D). Le test U de Mann-Whitney a été utilisé en (A) et (C) et le test exact de Fisher en (B) et (D).

### 5.3 Inflammation hépatique

Compte tenu de l'association possible entre inflammation hépatique et réponse immunitaire anti-VHC, l'implication de l'inflammation dans la pathologie lors de la grossesse a été examinée dans le cadre de cette étude (91).

Il est à noter que les résultats suivants ne concernent que le groupe de femmes mono-infectées. On peut y observer une association entre le profil de diversité de la quasiespèce et les niveaux d'ALT ( $p=0,0225$ , test de Mann-Whitney), et les niveaux d'aspartate aminotransférase (AST) ( $p=0,0276$ , test de Mann-Whitney). En effet, un profil de FD est associé avec des niveaux d'ALT et d'AST plus élevés, dont les moyennes sont respectivement de 41.50 et 51.48 IU/L. Les patientes HD présentaient des valeurs dans les normes pour les niveaux de ces enzymes hépatiques en grossesse, qui se situent en dessous 33 IU/L (Fig. 18A) (132). Additionné à ces constatations, des analyses complémentaires dénotent une association entre les niveaux d'AST, le pourcentage de neutralisation ( $p=0,0424$ , test de Mann-Whitney) et la TME du VHC ( $p=0,0412$ , test de Mann-Whitney) (Fig. 18B et C). Des niveaux d'AST élevés ont tendance à être accompagnés de pourcentages de neutralisation faibles et d'un risque accru de TME du VHC.



**Figure 18. Niveaux des marqueurs d'inflammation hépatique en fonction de la diversité de la quasiespèce, de l'activité neutralisante et de la TME chez les patientes mono-infectées**

Chez les patientes mono-infectées ( $n=14$ ), des niveaux significativement plus élevés d'AST et d'ALT sont observables chez les patientes FD (A). Des niveaux significativement plus importants d'AST sont observables chez les patientes ne présentant pas d'activité neutralisante et ayant transmis le virus (B, C). Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour ces trois figures.

## 5.4 Co-infection

Compte tenu des différences dans la dynamique de l'infection par le VHC entre les patientes mono-infectées et co-infectées, les moyennes de plusieurs données cliniques et expérimentales ont été comparées au moyen du test statistique de Mann-Whitney. Il a été possible de constater qu'aucune différence significative n'était observable entre la diversité de la quasispèce, la pression sélective, l'activité neutralisante ou l'inflammation hépatitique (AST et ALT). La seule donnée clinique différenciant les deux groupes était la virémie du VHC, qui était plus élevée chez les patientes co-infectées ( $p=0,0041$ , test de Mann-Whitney).

## **Discussion**

Notre hypothèse de recherche avançait que la réponse humorale maternelle dirigée contre le VHC pourrait être responsable des modulations de la pathologie de l'hépatite C au cours de la grossesse. Ces modulations ont été étudiées dans le contexte de deux réponses humorales, soit les réponses neutralisantes et l'ADCC, afin de mieux définir leur impact sur la santé de femmes enceintes infectées par le VHC. Les résultats de cette étude ont été intégrés à des données cliniques et expérimentales : charge virale du VHC, structure de la population virale, inflammation hépatique, incidence de la TME, etc.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'élaborer un système visant à quantifier l'activité ADCC spécifique au VHC. Dû à des complications techniques qui seront étayées subséquemment, cet objectif n'a pas été atteint. Néanmoins, cette étude laisse entrevoir un rôle des AC non-neutralisants dans l'inflammation hépatique observée en grossesse et au PP.

Dans un second temps, nous n'avons pas vu de différences significatives dans les niveaux des marqueurs sériques d'inflammation, dans l'activité neutralisante ou dans la virémie VHC entre chacun des trimestres de grossesse et le PP. L'impact sur les données cliniques et expérimentales de l'activité neutralisante moyenne lors de la grossesse a été évalué. Notre étude a révélé que cette réponse immunitaire exerce une pression sélective positive qui est accompagnée d'une diversification de la quasispèce du VHC, d'une diminution de l'inflammation hépatique et d'une diminution du risque de TME chez les femmes mono-infectées par le VHC

### **1. L'influence de l'ADCC sur la pathologie de l'hépatite C**

La grossesse est une période lors de laquelle les réponses humorales ont préséance sur les réponses à médiation cellulaire (113). Cela en fait un moment intéressant pour étudier l'impact restreint de cette réponse immunitaire. En plus de l'impact des réponses humorales neutralisantes pour le contrôle de l'infection, il est intéressant de se questionner sur les autres fonctions que peuvent avoir les AC.

Les AC non-neutralisants sont entre autres impliqués dans l'ADCC. Cette réponse immunitaire utilise des AC reconnaissant des épitopes viraux à la surface de cellules infectées pour recruter des cellules NK. Ces dernières provoquent la lyse des cellules marquées par les AC par relâche

de granules cytotoxiques (81). De cette façon, même sans être neutralisants, des AC peuvent tout de même avoir un effet antiviral. L'ADCC pourrait constituer une arme efficace contre le VHC, qui a développé des mécanismes afin de camoufler ses épitopes neutralisants.

### **1.1 Revue de la littérature : le rôle de l'ADCC dans le contrôle de l'infection par le VHC**

L'implication de l'ADCC dans le contrôle de l'infection par le VHC a été peu étudiée. Afin de définir son implication dans cette pathologie, il faudrait tout d'abord déterminer si les cellules effectrices de l'ADCC (cellules NK) sont fonctionnelles dans un contexte d'infection par le VHC. Ensuite, il faudrait contrôler si les AC anti-VHC produits sont aptes à diriger l'ADCC.

Premièrement, deux études ont évalué le potentiel cytotoxique par l'ADCC au moyen de cellules NK isolées de patients souffrant d'hépatite C chronique. Düesberg *et al.* ont établi que la réponse ADCC était équivalente chez des patients infectés par le VHC et chez des individus sains (133). Inversement, une étude plus récente a montré que l'ADCC de cellules NK était affaiblie dans un contexte de chronicité. En effet, bien que des fréquences plus élevées de cellules NK activées étaient observables chez des patients souffrant d'hépatite C, l'expression de CD16 était diminuée (134). L'activité des cellules NK contre le VHC a également été étudiée dans un contexte plus général. Malgré que certaines études avancent la présence de défauts d'activation des cellules NK dans l'hépatite C (135-137), plusieurs autres montrent une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK qui pourrait aller de pair avec l'ADCC (49, 97, 138). De manière intéressante, Ahlenstiel *et al.* ont démontré que l'expression du marqueur de dégranulation CD107a sur les cellules NK corrélait avec les dommages hépatiques référés par les niveaux d'ALT (97). De plus, dans un contexte de grossesse, les cellules NK recrutées à l'interface materno-fœtale suite à la détection du VHC présentent une expression augmentée de CD16, ainsi qu'une plus forte dégranulation (121).

Deuxièmement, notre système de quantification de la réponse ADCC ne s'étant malheureusement pas avéré fonctionnel, nous n'avons pas pu établir si des IgG extraits de patientes infectées par le VHC en grossesse pouvaient diriger la réponse ADCC spécifique au VHC. Néanmoins, Nattermann *et al.* ont démontré que le sérum d'individus en phase aigüe ou chronique de l'hépatite C, ainsi que le sérum d'individus ayant résolu l'infection, pouvait diriger la lyse spécifique de cellules cibles recouvertes de la protéine E2 par ADCC (96).

Ces éléments de la littérature sont prometteurs quant à l'implication de la réponse ADCC dans le contrôle de l'infection par le VHC en grossesse.

## 1.2 Intégration du rôle de l'ADCC dans le contrôle de l'infection par le VHC à la présente étude

Pour ce qui est de notre étude, les patientes mono-infectées de FD et n'ayant pas d'activité neutralisante anti-VHC présentaient une inflammation hépatique plus élevée que la normale (Fig. 18). Puisque le VHC n'est pas un virus lytique et que, dans l'hépatite C, les dommages hépatiques sont traditionnellement reliés à la réponse immunitaire, nous pensons que l'ADCC anti-VHC pourrait en partie être responsable des dommages hépatiques observés en grossesse (115-117).

On pourrait se demander si l'ADCC ne serait pas à blâmer pour l'inflammation anormale présente chez les patientes FD ne neutralisant pas les VHCpp (Fig.18). En effet, la liaison d'AC non-neutralisants sur certains épitopes de E2 a le potentiel d'interférer avec la neutralisation du virus (139-141). Il serait intéressant de déterminer si les individus ne neutralisant pas les VHCpp ont plutôt développé une réponse ADCC anti-VHC basée sur ces AC non-neutralisants. Ainsi, il est envisageable que les IgG anti-VHC

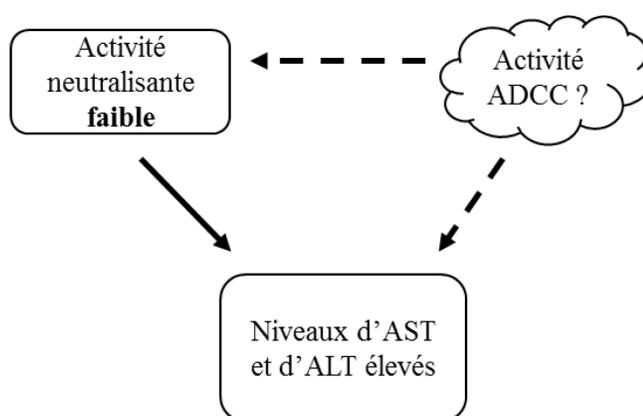


Figure 19. Rôle possible de l'activité ADCC chez les femmes mono-infectées

Trait épais: association significative;

Trait pointillé: relation hypothétique

produits chez les patientes ne démontrant pas de réponses neutralisantes servent à diriger la réponse ADCC et interfèrent avec la liaison d'AC neutralisant. Advenant qu'un tel phénomène soit observé, il serait utile d'avoir accès aux titres d'IgG anti-VHC produites par les patientes afin de contrôler que l'absence de neutralisation chez certaines patientes ne soient pas tout simplement la conséquence d'une production diminuée d'AC spécifiques au VHC.

Il est certes possible que l'ADCC reconnaisse des épitopes viraux à la surface des cellules infectées et détruise ainsi des foyers d'infection. Il est également probable que l'ADCC détruise des cellules auxquelles seraient liés des virions en voie d'entrée ou bien des protéines virales libres (96). L'ADCC aurait le potentiel de favoriser l'inflammation hépatique par la lyse spécifique et/ou non-spécifique d'hépatocytes. Une situation semblable a été observée avec le VIH, où la liaison de molécules de la glycoprotéine 120 (gp120) libre aux récepteurs CD4 de cellules voisines provoque une lyse causée par l'ADCC (142). De cette manière, l'ADCC anti-VHC pourrait avoir un rôle néfaste dans l'hépatite C en augmentant l'inflammation hépatique et la détérioration du foie.

### **1.3 Reconsidération du rôle de l'ADCC dans le contrôle de l'infection par le VHC**

L'essai développé ici avait comme objectif de déterminer si des IgG prélevés de patientes infectées pouvaient médier la lyse spécifique de cellules cibles présentant E1E2 à leur surface par ADCC dans un modèle *in vitro*. Malheureusement, les résultats obtenus par cet essai ne sont pas probants puisque le système de quantification de l'ADCC s'est retrouvé fautif en amont. C'est-à-dire que l'expression stable de E1E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup> n'a pas été obtenue et, de ce fait, on ne peut présumer que la lyse des cellules cibles observée, si lyse il y avait, est spécifique au VHC.

Faisons fi de cet aspect et questionnons-nous sur la probabilité de l'existence de la réponse ADCC *in vivo* chez les individus infectés par le VHC. Comme mentionné précédemment, l'expression d'antigènes viraux à la surface des cellules infectées est un prérequis pour diriger la réponse ADCC vers les foyers d'infection viraux. Or, le VHC est un virus qui excelle au camouflage de ses épitopes au cours de son cycle de réplication cellulaire. En effet, au niveau de l'entrée dans la cellule, le VHC est déjà en association avec différentes composantes lipidiques du sérum, ce qui contribue à camoufler ces épitopes immunogènes (10). De plus, l'assemblage et l'excrétion des particules virales s'effectuent en association avec la voie de sécrétion des VLDL : le VHC bourgeonne dans le RE et est acheminé à la surface dans des VL (1, 21). Ainsi, il n'y a pas d'assemblage viral à la membrane plasmique de la cellule, ce qui diminue les chances d'être détecté par des IgG en circulation. Sur ce point, nous avons cependant déterminé qu'une expression « leaky » de E1E2 était possible dans certaines

circonstances dans des modèles d'expression *in vitro* (92, 93). Cependant, la localisation *in vivo* de E1E2 n'est pas formellement établie et hypothèque notre compréhension réelle de la possibilité de la réponse ADCC spécifique au VHC.

Néanmoins, pour les besoins de cet exercice de pensée, supposons que E1E2 soit détectable par le système immunitaire à la surface des cellules infectées.

Que mesurons-nous réellement par le biais du système de quantification de la réponse ADCC spécifique au VHC développé ici ou par Nattermann *et al.* ? En prélevant des IgG du sérum de patients infectés, nous mesurons uniquement la capacité de ces IgG à médier l'ADCC *in vitro*. Cet essai ne nous permet pas de savoir si les IgG prélevés sont effectivement utiles à cette fin *in vivo*. En effet, ils pourraient tout aussi bien participer à la réponse neutralisante anti-VHC ou à la phagocytose. Afin de solidifier leurs observations, Nattermann *et al.* auraient dû effectuer un phénotypage des cellules NK, entre autres avec les facteurs CD107a et CD16, afin de démontrer que les cellules NK étaient biaisées vers un profil de dégranulation et de cytotoxicité chez les individus présentant un potentiel de réponse ADCC (97, 143). Alternativement, un essai d'ADCC *in vitro* effectué à partir de cellules NK prélevées chez ces patients aurait permis d'établir une corrélation entre la détection d'IgG pouvant médier l'ADCC et la fonctionnalité des cellules NK.

D'autre part, une bonne manière de déterminer l'impact d'une réponse immunitaire sur le contrôle d'une infection virale est de déterminer si sa présence influence le cours de l'infection. Les résultats obtenus par Nattermann *et al.* ne penchent pas dans cette direction puisqu'il n'y a pas de différences significatives entre des patients en phase aiguë, en phase chronique ou ayant résolu spontanément l'infection au niveau de l'ampleur de la réponse ADCC (96). De plus, comme établi par Pelletier *et al.*, le taux de dégranulation des cellules NK en phase aiguë de l'infection n'est pas un facteur prédictif de l'évolution de la maladie en phase chronique ou de sa résolution spontanée (144). Ainsi, sans dire que les résultats de Nattermann *et al.* sont erronés, on peut se questionner sur la véritable fonction des IgG étudiés ici et de l'impact de la réponse ADCC sur le contrôle de l'infection par le VHC.

## 2. Considérations techniques liées à l'élaboration d'un test mesurant l'activité ADCC spécifique au VHC

### 2.1 Système lentiviral d'expression de E1E2

Dans l'optique d'élaborer un système permettant de quantifier le potentiel d'AC anti-VHC dans la réponse ADCC, l'obtention de cellules cibles exprimant les glycoprotéines E1E2 à leur surface était essentielle. La première avenue envisagée pour arriver à ce but a été d'utiliser des vecteurs lentiviraux exprimant E1E2 de manière stable dans les cellules cibles CEM-NK<sup>R</sup>. Le vecteur 670-E1E2, dont l'expression est régie par le promoteur CMV, n'a pas permis l'expression des glycoprotéines d'enveloppe dans les cellules CEM-NK<sup>R</sup>, alors que leur expression était robuste dans les autres lignées cellulaires étudiées (HEK 293T et Huh 7.5) (Fig.9). Cela prouve que le vecteur d'expression n'était pas défectueux. De ce fait, le promoteur constitutif CMV est largement utilisé pour sa force d'expression dans les systèmes *in vitro*. Cependant, comme soulevé par Qin *et al.*, ce promoteur offre des taux d'expression des plus variables entre les lignées cellulaires étudiées, probablement par des mécanismes liés à la méthylation des îlots CpG (145-147). Malgré qu'une inhibition progressive de l'expression par méthylation serait habituellement visible au fil des passages en culture cellulaire et que dans notre cas l'expression de E1E2 n'a jamais eu lieu, nous avons envisagé que l'utilisation du promoteur CMV dans les CEM-NK<sup>R</sup> puisse être fautive.

Il s'est en effet avéré qu'un changement de promoteur affectait l'expression de E1E2 dans les CEM-NK<sup>R</sup>. Lorsque le promoteur PGK a été testé, nous avons obtenu une forte expression intracellulaire et de surface de ces glycoprotéines dans les cellules HEK 293T et Huh 7.5. Alors que dans les CEM-NK<sup>R</sup>, l'expression de E1E2 était limitée aux compartiments intracellulaires (Fig.9).

La connaissance de la localisation exacte de E1E2 est mitigée dans la littérature : pendant longtemps, l'utilisation d'un système d'expression dérivé du virus de la vaccine a laissé croire que le domaine de rétention de E1E2 dans la lumière du RE limitait leur expression aux compartiments intracellulaires (20, 126, 148). Cependant, lorsque le système d'expression de ces glycoprotéines est basé sur des vecteurs ADN plutôt que sur le virus de la vaccine, Drummer *et al.*, Dumonceaux *et al.* ainsi que nous-mêmes avons démontré que l'expression de E1E2 à la

surface était possible dans une variété de cellules (HEK 293T, Huh 7.5, HeLa, NKNT3) (92, 93). Dans ces conditions, la migration de E1E2 à la surface est considérée comme « leaky », la majorité des protéines étant effectivement retenue au RE (92). Cette expression « leaky » pourrait expliquer qu'on n'obtienne pas de E1E2 à la surface des cellules CEM-NK<sup>R</sup> si on suppose un niveau d'expression plus faible dans ces cellules. Il est également possible que ces systèmes d'expression *in vitro* introduisent des biais dans la localisation de E1E2 : malheureusement, il n'existe pas de données à notre connaissance permettant de faire le point sur l'expression de E1E2 à la surface d'hépatocytes *in vivo* (149-151).

## 2.2 Interaction de E1E2 avec CD81

Comme d'autres virus, le VHC pourrait diminuer l'expression de son récepteur à la surface des cellules afin d'interférer avec la surinfection. Par rapport à ce point, Ke *et al.* ont montré une interaction entre l'ARN viral et CD81 qui provoquait la rétention de ce dernier dans des compartiments intracellulaires (152). Pour ces raisons, nous avons supposé que l'interaction du VHC avec CD81 dans le RE pourrait entraver la migration d'E1E2 à la surface et donc empêcher l'expression « leaky » de ces glycoprotéines à la surface des CEM-NK<sup>R</sup>. Afin de tester cette hypothèse, nous avons entrepris de supprimer l'expression de CD81 dans les CEM-NK<sup>R</sup> grâce au système d'édition génique CRISPR-Cas9.

Il semble pertinent d'insérer ici une parenthèse sur les deux systèmes de CRISPR-Cas9 utilisés dans cet essai. Le système basé sur des vecteurs lentiviraux pour l'expression des ARNg et de la nucléase Cas9 était largement supérieur à celui basé sur la transfection directe des ARNg et de la nucléase. L'expression stable par les vecteurs lentiviraux a permis d'accroître le pourcentage de cellules négatives pour CD81 de 12 % à 46,9 % (Fig.11 et Annexe 4). Au contraire, les 8,1 % de cellules négatives pour CD81 obtenues par transfection directe des ARNg et de Cas9 ne se sont pas maintenus dans le temps (Fig. 10). Le système lentiviral a permis la sélection préalable d'une lignée de CEM-NK<sup>R</sup> exprimant stablement la nucléase Cas9 avant d'entreprendre l'infection par des lentivirus codant pour les ARNg. Cela a fortement augmenté les chances d'avoir une cellule exprimant la nucléase et les ARNg simultanément. Au contraire, la transfection directe de la nucléase et des ARNg offrait uniquement une expression transitoire

dans la cellule, ce qui n'a pas favorisé l'édition génique d'un génome diploïde et l'expansion du phénotype recherché dans la population.

Concernant les résultats obtenus suite à l'infection de la lignée CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> avec des lentivirus exprimant E1E2, ceux-ci n'ont pas permis d'arriver au résultat escompté. En effet, la délétion du gène CD81 n'a pas permis de rétablir les taux d'expression d'E1E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup>. En fait, l'expression intracellulaire d'E1E2 était même deux fois plus faible dans les cellules CEM-NK<sup>R</sup> CD81<sup>-</sup> que dans leur homologue CD81<sup>+</sup> (Fig.11). En somme, la rétention d'E1E2 dans les compartiments intracellulaires des CEM-NK<sup>R</sup> n'est pas la conséquence d'une interaction avec CD81. La rétention d'E1E2 à l'intérieur de la cellule semble plutôt être dépendante du type de cellule sélectionnée ou du type de système d'expression utilisé.

### **2.3 E2 soluble et essai d'ADCC**

Finalement, nous avons opté pour un système basé sur la liaison d'une version soluble de la protéine E2 à la surface des CEM-NK<sup>R</sup> afin de diriger la réponse ADCC. Ce système est sous-optimal puisqu'il ne permettrait pas de déceler la présence d'AC anti-E1 pouvant diriger l'ADCC. Dans un premier temps, nous avons montré que la liaison d'E2 soluble était spécifique à CD81 et que la quantité d'E2 liée atteignait un plateau à une concentration de 70 µg/ml. Cependant, cette liaison ne perdurait pas après 3h d'incubation à cause de la dégradation d'E2 par des protéases cellulaires (Fig. 12). Il y a fort à parier que cette dégradation était très rapide si on considère que la saturation de la liaison de E2 à CD81 est atteinte à 70 µg/ml, alors que Rosa *et al.* ont obtenu saturation à 10 µg/ml (153). Bien que les cellules utilisées pour la liaison d'E2 dans cette étude soient des cellules MOLT-4 et que cela puisse affecter le nombre de sites de liaisons à CD81 disponibles, nous supposons que c'est la méthode de production de la protéine E2 qui différencie ces deux expériences. En effet, Rosa *et al.* ont utilisé une E2 produite dans des cellules CHO, alors que notre E2 a été commercialement synthétisée dans des cellules HEK 293T. Il se pourrait que le patron de glycosylation dans les CHO, qui est habituellement plus exhaustif que dans les HEK 293T, permette une plus grande stabilité de la protéine E2 soluble (154, 155).

Le manque de stabilité de la protéine E2 soluble a probablement été la cause de l'insuccès des essais d'ADCC. Il est pertinent de mentionner que la seule étude disponible sur l'activité ADCC

d'IgG anti-VHC a utilisé une protéine E2 soluble produite dans des CHO (96). D'autre part, dans notre étude, il n'y a pas eu de différence entre la mortalité spécifique par l'ADCC des CEM-NK<sup>R</sup> recouvertes ou pas par E2, ce qui laisse penser que la protéine E2 se dégrade trop rapidement pour diriger la réponse ADCC (Fig.13). De plus, l'utilisation d'un mélange contenant des inhibiteurs de sérines protéases afin de préserver une fraction des protéines E2 soluble n'est vraiment pas idéale dans un essai d'ADCC où on quantifie la mortalité des cellules cibles induite par la libération de granzymes, qui sont elles-mêmes des sérines protéases (84).

Enfin, un dernier point faible de ce système d'ADCC est le bruit de fond lors de la lecture du nombre de cellules viables en cytométrie en flux. Dans ce système, la mortalité causée par l'ADCC est calculée par le nombre relatif de cellules cibles viables dans chaque condition par rapport au nombre de billes « Accucount ». Ainsi, lors du transfert des cellules de la plaque 96 puits aux tubes adaptés à la lecture en cytométrie en flux, il était primordial de s'assurer de bien récupérer toutes les cellules. C'est ce qui explique pourquoi le bruit de fond était aussi élevé à la Figure 13 B. Néanmoins, il est possible de contrôler ce facteur en acquérant plus d'expérience, comme on voit à la Figure 13 C où le bruit de fond était maintenu à moins de 5% de l'activité ADCC. Cependant, à cette même figure, un pourcentage d'ADCC négatif est parfois obtenu et représente une situation où le nombre de cellules cibles viables est supérieur en présence d'IgG qu'en leur absence. Cette observation illustre l'inefficacité de ce système à détecter la réponse ADCC spécifique au VHC, pour les raisons énoncées plus haut, mais également le manque de sensibilité de la méthode. Pour remédier à ce dernier point, il serait intéressant d'utiliser un lecteur de cytométrie en plaque qui permettrait de réduire l'incertitude créée par le transfert imparfait des cellules.

#### **2.4 Amélioration du système de quantification de l'ADCC**

Plusieurs avenues pourraient être envisagées pour améliorer cet essai d'ADCC. Premièrement, nous pourrions produire la protéine E2 soluble dans des cellules CHO afin d'en améliorer la stabilité. Deuxièmement, nous pourrions changer de cellules cibles. Puisque l'on sait qu'E1E2 migre à la surface des Huh 7.5, ces cellules pourraient être considérées à condition que la lyse médiée autrement que par l'ADCC par les cellules NK ne soit pas excessive. Dans le cas contraire, on pourrait tenter d'isoler un clone NK<sup>R</sup> par incubation avec des concentrations

croissantes de PBMC comme ça a été le cas avec la création des cellules CEM-NK<sup>R</sup> (104). Finalement, la construction d'une protéine chimère contenant les glycoprotéines E1 et E2 du VHC, mais les domaines transmembranaires des protéines d'enveloppe du virus de la forêt de Semliki (VFS), aurait pu être envisagée. C'est une avenue qu'a entreprise Dumonceaux *et al.* et qui a mené à l'expression fidèle de E1E2 à la surface des cellules (93). Il est probable que dans ces conditions, E1E2 se rendent à la surface des CEM-NK<sup>R</sup> puisque le VFS bourgeonne naturellement à la membrane plasmique (156). Une de ces options permettra certainement d'obtenir des cellules cibles qui permettront la quantification de l'activité ADCC spécifique au VHC.

### **3. Rôle de la réponse humorale neutralisante dans la pathologie de l'hépatite C.**

#### **3.1 La réponse humorale exerce une pression sélective menant à la diversification de la quasiespèce du VHC lors de la grossesse.**

Utilisant une polymérase ARN sans correction d'erreur, le VHC est prompt à la diversification : il se comporte, chez un individu, comme une famille de variantes génétiquement apparentées nommée quasiespèce (2). Cette variabilité est, dans le cas du VHC, largement concentrée dans les régions HVR1 à 3 de la glycoprotéine d'enveloppe E2. La quasiespèce du VHC se diversifie entre autres en réponse aux pressions sélectives présentes dans son environnement (67, 157). Dû à l'exposition de E2 à la surface du virion, les réponses humorales constituent une pression sélective d'importance influençant l'évolution des protéines d'enveloppe du VHC (70, 158, 159).

Liu *et al.* ont précédemment démontré que la diversification de HVR1 apparaissait avec l'instauration des réponses neutralisantes et que la divergence des séquences de cette région augmentait au fil de l'infection (64). La première observation a été consolidée dans notre étude où une corrélation entre la diversité de la quasiespèce et la force des réponses neutralisantes a été observée au sein du groupe à l'étude dans son ensemble ( $p=0,0095$ , Test de corrélation de Spearman). De plus, on n'observe une différence significative entre les patientes HD et FD au niveau de l'activité neutralisante que lorsqu'on examine la cohorte entière ( $p=0,0239$ , Test de

Mann-Whitney) ou le groupe co-infecté ( $p=0,0337$ , Test de Mann-Whitney). Chez les patientes mono-infectées, l'association entre l'activité neutralisante et le profil de diversité de la quasiespèce n'est pas significative. Cependant, une tendance est tout de même observée puisque toutes les patientes HD ont montré une activité neutralisante anti-VHC au-dessus du seuil de 50% de neutralisation (Fig.16).

De manière anecdotique, il a été observé lors de grossesses consécutives chez certaines patientes (TVC79, TV247, TVC17) que la diversité de la quasiespèce ainsi que les réponses neutralisantes étaient augmentées, ce qui confirme la deuxième observation de Liu *et al.* Inversement, les patientes ayant une quasiespèce monovariante ne présentaient pas d'activité neutralisante à l'exception de la patiente 16 (Fig.15). Il semble clair de par ces observations que les réponses neutralisantes et la diversification de la quasiespèce vont de pair.

De plus, la présence de réponses neutralisantes est associée à un niveau plus élevé de mutations non-synonymes, ce qui indique la présence d'une pression sélective positive influençant la diversité des variantes de la quasiespèce (Fig.16) (128, 131). Il existe une forte corrélation entre l'augmentation des dN, l'ISNM et l'efficacité de l'activité neutralisante ( $p<0,0001$ , Test de corrélation de Spearman). Cette corrélation est visible chez les patientes mono-infectées et co-infectées.

Ainsi, on peut conclure que les réponses neutralisantes anti-VHC exercent une pression sélective qui mène à la diversification de la quasiespèce du VHC chez les patientes mono-infectées et co-infectées.

### **3.2 La diversification de la quasiespèce contribue au contrôle de la TME**

On peut alors se demander : quel est l'impact de la diversification de la quasiespèce due aux réponses neutralisantes dans la pathologie de l'hépatite C? Quel est le rôle des réponses neutralisantes dans le contrôle de l'infection ? Comme expliqué précédemment, ce rôle n'est pas bien défini. Certaines études ont montré qu'une diversification rapide de la quasiespèce du VHC et une réponse humorale précoce et étendue étaient associées à une résolution spontanée de l'infection (70, 158, 160). Ainsi, la production d'AC neutralisants, qui amènerait la diversification de la quasiespèce, pourrait avoir un impact positif sur le contrôle de l'infection.

Dans cette étude, nous avons observé que la diversification de la quasiespèce était un facteur protecteur contre la TME chez les patientes mono-infectées par le VHC : les patientes HD ont 26 fois moins de chance de transmettre le VHC à leur enfant ( $p=0,0108$ , Test exact de Fisher). De plus, la TME est significativement associée à un ISNM plus bas correspondant à un profil FD ( $p=0,0095$ , Test de Mann-Whitney).

Pour ce qui est de l'impact direct de l'activité neutralisante sur la TME, une tendance est observée pour les patientes mono-infectées : les patientes n'ayant pas transmis le VHC ont toutes un pourcentage de neutralisation des VHCpp supérieur au seuil de 50% (Fig.17). Il est important de noter que ces dernières observations sur l'impact de l'activité neutralisante sur la TME ne concernent que les patientes mono-infectées. L'implication de ces facteurs dans un contexte de co-infection sera détaillée plus tard.

Une hypothèse possible est que la diversification du VHC, qui, comme nous l'avons démontré, est associée à l'évasion de la réponse humorale, engendre un coût pour le virus. La réponse humorale anti-VHC pourrait contribuer indirectement à diminuer la réplication virale. En effet, la mutation dans la séquence d'une variante donnée peut être avantageuse au niveau de l'évasion immunitaire, mais être désavantageuse au niveau de l'infectivité (71, 72). C'est ce qu'ont observé Keck *et al.*, lors de la purification d'un mutant d'évasion de la réponse immunitaire humorale. Ce mutant résistait à la neutralisation, mais présentait une affinité de liaison à CD81 diminuée allant de pair avec une baisse d'infectivité (72). Bien qu'il soit discutable d'extrapoler des observations relatives à la structure d'une quasiespèce à l'aptitude évolutive de chacune de ses variantes, certaines données de notre étude laissent croire que la diversification de la quasiespèce est néfaste à l'infectivité du VHC. Cette diminution d'infectivité se reflèterait ici par un risque moins élevé de TME du VHC.

### 3.3 La diversification de la quasiespèce contribue au contrôle de l'inflammation hépatique

Toujours chez les patientes mono-infectées, nos résultats montrent que la diversification de la quasiespèce est associée à des dommages hépatiques plus faibles, évalués avec les niveaux d'ALT et AST. Ceux-ci sont normaux chez les femmes HD et plus élevés que la normale chez les femmes FD (132). Des résultats semblables ont été observés par Farci *et al* chez des enfants infectés par TME du VHC. Dans leur étude, des niveaux d'ALT élevés ont été observés chez des enfants infectés par TME présentant une stabilité et une homogénéité dans la séquence HVR1. Inversement, les enfants dont la

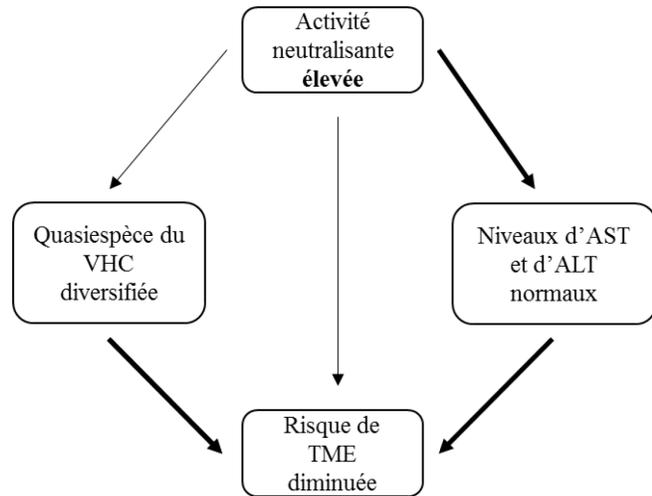


Figure 20. Impact de l'activité neutralisante chez les femmes mono-infectées

Trait épais: association significative;

Trait fin: tendance non-significative

quasiespèce s'est diversifiée se situaient dans les normes (161). Cela nous amène à penser que la diversification de la quasiespèce pourrait freiner la détérioration de la fonction hépatique chez les individus souffrant d'hépatite C. On constate également que des niveaux d'AST plus bas sont associés à la présence de neutralisation des VHCpp (Fig. 18). Ces résultats complètent le portrait dressé par Ruiz-Extremera *et al.* chez la femme enceinte infectée par le VHC : cette équipe a remarqué que les femmes dont les niveaux d'ALT étaient plus hauts que la normale suite à l'accouchement présentaient une production accrue de cytokines Th1 (162). Un déséquilibre dans le ratio Th1/Th2 vers le profil Th2 pourrait donc constituer un facteur de protection contre la détérioration hépatique. De plus, en accord avec la littérature, un risque augmenté de TME concorde avec des niveaux d'inflammation hépatique anormaux, tels que révélés par la concentration sérique d'AST dans notre étude (163, 164). Une tendance non-significative est également observable avec les niveaux d'ALT (Fig.18).

En somme, la pression immunitaire humorale anti-VHC est un facteur important d'augmentation de la diversification de la quasiespèce et de diminution de l'inflammation

hépatique chez les patientes mono-infectées. Possiblement, la pression humorale anti-VHC pourrait constituer un facteur protecteur contre la TME.

### **3.4 Impact de la co-infection par le VIH**

Tout comme les patientes mono-infectées par le VHC, les patientes infectées par le VHC et le VIH présentent une diversification de leur quasiespèce qui est associée à la présence de réponses neutralisantes (Fig.16). Contrairement aux femmes mono-infectées, la diversification de la quasiespèce et le développement de réponses neutralisantes ne sont pas des facteurs protecteurs contre la TME du VHC chez ces patientes. Au contraire, les deux patientes co-infectées ayant transmis le VHC à leur enfant présentent un profil HD et des réponses neutralisantes d'environ 80% (Fig.17). Ainsi, il semble que les réponses neutralisantes et la diversification de la quasiespèce ne suffisent pas à protéger de la TME chez les patientes co-infectées. De plus, en accord avec la littérature, une virémie plus élevée a été observée chez les patientes co-infectées ( $p=0,0041$ , Test de Mann-Whitney) et pourrait vraisemblablement affecter à la hausse les risques de TME dans la cohorte (révisé dans (105)).

De prime abord, on serait tenté de dire que l'infection par le VIH pourrait affecter la réponse immunitaire anti-VHC. Le VIH, de par la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, altère les réponses anti-VHC entre autres par la diminution des réponses lymphoprolifératives et le titre et l'ampleur des AC neutralisants spécifiques au VHC (110, 111). Cependant, il est important de mentionner que les femmes co-infectées étaient sous cART, qui permet le rétablissement des décomptes normaux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et du risque de TME du VHC au même niveau que pour les patientes mono-infectées (44-46).

Dans un autre ordre d'idées, plusieurs études ont montré que le risque de TME du VIH et d'autres virus augmentait lorsque des dommages au placenta étaient observés (165, 166). Des résultats non-publiés d'une étude antérieure au sein de notre équipe ont montré un goulot d'étranglement moins restrictif lors de la TME du VHC chez les patientes co-infectées qui pourrait être dû à la présence d'inflammation placentaire qui compromet la barrière materno-fœtale (165, 166). En effet, 184 et 109 variantes ont été transmises pour les patientes co-infectées TVC55 et TV389, alors que 2 et 4 variantes ont été transmises pour les patientes mono-infectées TVC79 et TVC189 (167). Qui plus est, une étude récente a rapporté un risque accru de

développer des lésions vasculaires placentaires chez les femmes enceintes infectées par le VIH même sous cART (168). Ainsi, le mécanisme responsable de la TME du VHC chez les patientes co-infectées dépendrait moins de la réponse immunitaire et de la cinétique virale que chez les patientes mono-infectées.

### **3.5 Améliorations à apporter aux essais de neutralisation**

Premièrement, l'activité neutralisante mesurée par le système de VHCpp est possiblement biaisée par le système d'expression utilisé. En effet, des différences dans le patron de glycosylation et dans le repliement des glycoprotéines E1E2 ont été observées entre le système de VHCpp et de VHCcc. Ces différences ont été associées au système de production des particules virales : les VHCpp sont produits dans des cellules HEK 293T, alors que les VHCcc, plus fidèles au contexte d'infection *in vivo*, sont produites dans une lignée d'hépatomes Huh 7.5 (169). Il est ainsi envisageable que les VHCpp étudiées ici présentent une sensibilité augmentée à la neutralisation si le patron de glycosylation dans les HEK 293T n'est pas fidèle à la situation *in vivo*. Il aurait donc été intéressant de comparer les résultats obtenus avec les VHCpp avec un système de VHCcc.

Deuxièmement, il aurait été pertinent de tester l'ampleur et le titre des AC anti-VHC. En effet, nous aurions pu tester l'activité neutralisante des IgG extraites du sérum des patientes infectées sur une plus grande variété de VHCpp afin de déterminer l'ampleur de la réponse humorale développée. Ces informations auraient été révélatrices de d'autres aspects de la réponse humorale anti-VHC.

Finalement, il faut mentionner ici que seulement 6 patientes (4 mono-infectées et 2 co-infectées) ayant transmis le VHC ont été étudiées au niveau de leur activité neutralisante. Il faudrait définitivement recruter plus de patientes pour vérifier si les tendances observées se maintiennent, en particulier pour les femmes co-infectées. En effet, celles-ci semblent emprunter une voie distincte des femmes mono-infectées au niveau de la TME du VHC.

## **Conclusion**

Pour conclure, cette étude a contribué à mieux comprendre le rôle des réponses humorales neutralisantes dans la pathologie de l'hépatite C lors de la grossesse et a avancé des hypothèses quant à l'influence de l'ADCC sur la pathogénèse l'hépatite C au cours de cette période.

Les réponses humorales neutralisantes ont ici été définies comme protectrices dans un contexte de TME. En effet, de par leur effet de diversification de la quasiespèce du VHC, les réponses humorales neutralisantes diminuent les risques de TME en plus de limiter l'inflammation hépatique. Si ces mécanismes sont vrais dans les patientes mono-infectées, la situation semble plus compliquée chez les patientes co-infectées chez qui la présence de diversification de la quasiespèce et de réponses neutralisantes ne suffisent pas à diminuer les risques de TME.

Ainsi, l'étude de la diversité de la quasiespèce et des réponses neutralisantes serait un bon facteur prédictif du risque de TME chez les femmes mono-infectées. Cela pourrait dicter de prochaines lignes de conduite dans la prise en charge de femmes enceintes dans un contexte de grossesse. En effet, les femmes ayant une faible diversité de leur quasiespèce et une absence de réponses neutralisantes sont plus à risque de transmettre le VHC à leur progéniture. Bien évidemment, l'innocuité des nouveaux DAA en grossesse reste encore à être déterminée avant de considérer leur administration aux femmes enceintes.

L'élaboration d'un système visant à quantifier l'activité ADCC spécifique au VHC a également été entreprise au cours de cette étude. N'ayant pas réussi à obtenir une expression stable d'E1E2 à la surface des cellules cibles afin de diriger la réponse ADCC, ce système n'a ultimement pas vu le jour. Néanmoins, les difficultés rencontrées ont permis de mieux définir la voie à suivre pour arriver à développer un système fonctionnel. L'étude de la dynamique de différents facteurs lors de l'infection par le VHC durant la grossesse laisse présager un rôle des AC non-neutralisants dans l'inflammation hépatique, qui pourrait être relié à la réponse ADCC.

En somme, le rôle des AC anti-VHC lors de la grossesse a été bien défini dans cette étude au niveau de leur capacité neutralisante. Inversement leur capacité à diriger la cytotoxicité cellulaire reste encore à définir, mais promet d'avoir un impact important sur la pathogénèse de l'hépatite C en grossesse.

## **Bibliographie**

1. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle--an update. *Journal of Hepatology*. 2014;61(1 ):S3-S13.
2. Martel M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology*. 1992;66(5):3225-9.
3. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-27.
4. Gentzsch J, Brohm C, Steinmann E, Friesland M, Menzel N, Vieyres G, et al. Hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathogens*. 2013;9(5):e1003355.
5. McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, et al. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2007;104(8):2879-84.
6. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(6):453-63.
7. Bartosch B, Verney G, Dreux M, Donot P, Morice Y, Penin F, et al. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *Journal of Virology*. 2005;79(13):8217-29.
8. Voisset C, Callens N, Blanchard E, Op De Beeck A, Dubuisson J, Vu-Dac N. High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(9):7793-9.
9. Dreux M, Boson B, Ricard-Blum S, Molle J, Lavillette D, Bartosch B, et al. The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(44):32357-69.
10. Dao Thi VL, Dreux M, Cosset FL. Scavenger receptor class B type I and the hypervariable region-1 of hepatitis C virus in cell entry and neutralisation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2011;13:e13.
11. Lavillette D, Tarr AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, et al. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2005;41(2):265-74.
12. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature medicine*. 2013;19(7):837-49.
13. Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guerin M, Mancip J, Granio O, et al. Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *Journal of Biochemical Technology*. 2012;287(37):31242-57.
14. Feneant L, Levy S, Cocquerel L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses*. 2014;6:535-72.
15. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*. 2006;80(14):6964-72.

16. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*. 2005;309:1577-81.
17. Filipe A, McLauchlan J. Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche. *Trends in Molecular Medicine*. 2015;21(1):34-42.
18. Roingard P, Hourieux C, Blanchard E, Prensier G. Hepatitis C virus budding at lipid droplet-associated ER membrane visualized by 3D electron microscopy. *Histochemistry Cell Biology*. 2008;130(3):561-6.
19. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology*. 2007;9(9):1089-97.
20. Cocquerel L, Meunier J-C, A P, Wychowski C, Dubuisson J. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of Virology*. 1998;72(3):2183-91.
21. Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2007;104(14):5848-53.
22. Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244:359-62.
23. Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*. 2006;55(9):1350-9.
24. Catanese MT, Dorner M. Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology*. 2015;479-480:221-33.
25. Li G, De Clercq E. Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Research*. 2017;142:83-122.
26. Lohmann V, Körner F, Koch J-O, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999;285:110-3.
27. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;197(5):633-42.
28. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*. 2005;11(7):791-6.
29. Abdelwahab KS, Ahmed Said ZN. Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(2):862-73.
30. Barth H. Hepatitis C virus: Is it time to say goodbye yet? Perspectives and challenges for the next decade. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;7(5):725-37.
31. Cashman SB, Marsden BD, Dustin LB. The humoral immune response to HCV: Understanding is key to vaccine development. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:550.
32. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5):S21-9.
33. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57(4):1333-42.
34. Abdel-Hakeem MS, Shoukry NH. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:274.

35. (CDC) CfDC. Hepatitis C Information: Center for Diseases Control [updated 2016-10-17/2017-03-30]. Available from: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/cfaq.htm>.
36. Heathcote EJ. Prevention of hepatitis C virus–related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5):S294-S302.
37. Le Campion A, Larouche A, Fauteux-Daniel S, Soudeyns H. Pathogenesis of hepatitis C during pregnancy and childhood. *Viruses*. 2012;4(12):3531-50.
38. Prasad MR, Honegger JR. Hepatitis C virus in pregnancy. *American Journal of Perinatology*. 2013;30(2):149-59.
39. Arshad M, El-Kamary Ss Fau - Jhaveri R, Jhaveri R. Hepatitis C virus infection during pregnancy and the newborn period--are they opportunities for treatment? *Journal of Viral Hepatitis*. 2011;18(4):229-36.
40. Tovo PA, Calitri C, Scolfaro C, Gabiano C, Garazzino S. Vertically acquired hepatitis C virus infection: Correlates of transmission and disease progression. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(4):1382-92.
41. Mok J, Pembrey L, Tovo PA, Newell ML, European Paediatric Hepatitis CVN. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*. 2005;90(2):F156-60.
42. Indolfi G, Azzari C, Resti M. Perinatal transmission of hepatitis C virus. *Journal of Pediatrics*. 2013;163(6):1549-52
43. Nie QH, Gao LH, Cheng YQ, Huang XF, Zhang YF, Luo XD, et al. Hepatitis C virus infection of human cytotrophoblasts cultured in vitro. *Journal of Medical Virology*. 2012;84(10):1586-92.
44. Snijdewind IJ, Smit C, Schutten M, Nellen FJ, Kroon FP, Reiss P, et al. Low mother-to-child-transmission rate of hepatitis C virus in cART treated HIV-1 infected mothers. *Journal of Clinical Virology*. 2015;68:11-5.
45. Jamieson DJ, Skunodom N, Chaowanachan T, Roongpisuthipong A, Bower WA, Chotpitayasunondh T, et al. Infection with hepatitis C virus among HIV-infected pregnant women in Thailand. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2008;2008.
46. Ferrero S, Lungaro P, Bruzzone BM, Gotta C, Bentivoglio G, Ragni N. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10-year survey (1990–2000). *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2003;82(3):229-34.
47. Park SH, Reherrmann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*. 2014;40(1):13-24.
48. Terilli RR, Cox AL. Immunity and hepatitis C: a review. *Current HIV/AIDS Reports*. 2013;10(1):51-8.
49. Zeromski J, Mozer-Lisewska I, Kaczmarek M, Kowala-Piaskowska A, Sikora J. NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2011;59(6):449-55.
50. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science*. 2004;306:1517-9.
51. Keating SE, Zaiatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, et al. Metabolic reprogramming supports IFN-gamma production by CD56 bright NK cells. *The Journal of Immunology*. 2016;196(6):2552-60.
52. Golden-Mason L, Cox AL, Randall JA, Cheng L, Rosen HR. Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology*. 2010;52(5):1581-9.

53. Ahlenstiel G, Edlich B, Hogdal LJ, Rotman Y, Nouredin M, Feld JJ, et al. Early changes in natural killer cell function indicate virologic response to interferon therapy for hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1231-9.
54. Knapp S, Warshaw U, Hegazy D, Brackenbury L, Guha IN, Fowell A, et al. Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology*. 2010;51(4):1168-75.
55. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*. 2005;436(7053):946-52.
56. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver - from homeostasis to disease. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*. 2016;13(2):88-110.
57. Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, et al. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *Journal of Virology*. 2011;85(1):596-605.
58. Irshad M, Khushboo I, Singh S, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *International Reviews of Immunology*. 2008;27(6):497-517.
59. Kared H, Fabre T, Bedard N, Bruneau J, Shoukry NH. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathogens*. 2013;9(6):e1003422.
60. Lechner F, Wong DKH, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, et al. Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000;191:1499-512.
61. Smyk-Pearson S, Tester IA, Lezotte D, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Rosen HR. Differential antigenic hierarchy associated with spontaneous recovery from hepatitis C virus infection: Implications for vaccine design. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(4):454-63.
62. Zhang C, Hua R, Cui Y, Wang S, Yan H, Li D, et al. Comprehensive mapping of antigen specific T cell responses in hepatitis C virus infected patients with or without spontaneous viral clearance. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171217.
63. Dustin LB, Cashman SB, Laidlaw SM. Immune control and failure in HCV infection--tipping the balance. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014;96(4):535-48.
64. Liu L, Fisher BE, Dowd KA, Astemborski J, Cox AL, Ray SC. Acceleration of hepatitis C virus envelope evolution in humans is consistent with progressive humoral immune selection during the transition from acute to chronic infection. *Journal of Virology*. 2010;84(10):5067-77.
65. Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(4):267-76.
66. Pascal Lapierre MT, Fernando Alvarez et Hugo Soudeyns. Structural basis for broad neutralization of hepatitis C virus quasispecies. *PLoS One*. 2011;6(10):1-9.
67. Troesch M, Meunier I, Lapierre P, Lapointe N, Alvarez F, Boucher M, et al. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology*. 2006;352(2):357-67.
68. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology*. 2007;132(2):667-78.
69. Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of

hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2007;104(14):6025-30.

70. Dowd KA, Netski DM, Wang XH, Cox AL, Ray SC. Selection pressure from neutralizing antibodies drives sequence evolution during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2377-86.

71. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathogens*. 2010;6(7):e1001005.

72. Keck ZY, Li SH, Xia J, von Hahn T, Balfe P, McKeating JA, et al. Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81 binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. *Journal of Virology*. 2009;83(12):6149-60.

73. Ray SC, Fanning L, Wang XH, Netski DM, Kenny-Walsh E, Thomas DL. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(11):1753-9.

74. Castelli M, Clementi N, Pfaff J, Sautto GA, Diotti RA, Burioni R, et al. A biologically-validated HCV E1E2 heterodimer structural model. *Scientific Reports*. 2017;7(1):214.

75. Koutsoudakis G, Dragun J, Perez-Del-Pulgar S, Coto-Llerena M, Mensa L, Crespo G, et al. Interplay between basic residues of hepatitis C virus glycoprotein E2 with viral receptors, neutralizing antibodies and lipoproteins. *PLoS One*. 2012;7(12):e52651.

76. McCaffrey K, Gouklani H, Boo I, Pountourios P, Drummer HE. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *Journal of General Virology*. 2011;92:112-21.

77. Kong L, Giang E, Nieusma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, et al. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science*. 2013;342(6162):1090-4.

78. Kong L, Giang E, Robbins JB, Stanfield RL, Burton DR, Wilson IA, et al. Structural basis of hepatitis C virus neutralization by broadly neutralizing antibody HCV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2012;109(24):9499-504.

79. Khan AG, Whidby J, Miller MT, Scarborough H, Zatorski AV, Cygan A, et al. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature*. 2014;509(7500):381-4.

80. Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nature Medicine*. 2008;14(1):25-7.

81. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:368.

82. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 2012;119(24):5640-9.

83. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux B, et al. Specificity and affinity of human Fc receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009;113(16):3716-25.

84. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual Review Immunology*. 2008;26:389-420.

85. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*. 2005;42(4):501-10.

86. Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current Opinion in Immunology*. 2007;19(3):301-8.

87. Excler JL, Ake J, Robb ML, Kim JH, Plotkin SA. Nonneutralizing functional antibodies: a new "old" paradigm for HIV vaccines. *Clinical Vaccine Immunology*. 2014;21(8):1023-36.
88. Liu Q, Fan C, Li Q, Zhou S, Huang W, Wang L, et al. Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity-inducing antibodies significantly affect the post-exposure treatment of Ebola virus infection. *Scientific Reports*. 2017;7:45552.
89. Vanderven HA, Jegaskanda S, Wheatley AK, Kent SJ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity and influenza virus. *Current Opinion in Virology*. 2017;22:89-96.
90. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(14):1275-86.
91. Spengler U, Nattermann J. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clinical Science*. 2007;112(3):141-55.
92. Drummer HE, Maerz A, Pountourios P. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Letters*. 2003;546(2-3):385-90.
93. Dumonceaux J, Cormier EG, Kajumo F, Donovan GP, Roy-Chowdhury J, Fox IJ, et al. Expression of unmodified hepatitis C virus envelope glycoprotein-coding sequences leads to cryptic intron excision and cell surface expression of E1/E2 heterodimers comprising full-length and partially deleted E1. *Journal of Virology*. 2003;77(24):13418-24.
94. Yoon JC, Yang CM, Song Y, Lee JM. Natural killer cells in hepatitis C: Current progress. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(4):1449-60.
95. Tatsumi T, Takehara T. Impact of natural killer cells on chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 2016;46:416-22.
96. Nattermann J, Schneiders AM, Leifeld L, Langhans B, Schulz M, Inchauspe G, et al. Serum antibodies against the hepatitis C virus E2 protein mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *Journal of Hepatology*. 2005;42(4):499-504.
97. Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, Edlich B, Feld JJ, Rotman Y, et al. Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology*. 2010;138(1):325-35.
98. Tyler DS, Stanley SD, Zolla-Pazner S, Gorny MK, Shadduck PP, Langlois AJ, et al. Identification of sites within gp41 that serve as targets for antibody-dependent cellular cytotoxicity by using human monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology*. 1990;145:3276-82.
99. Gomez-Roman VR, Florese RH, Patterson LJ, Peng B, Venzon D, Aldrich K, et al. A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal Immunological Methods*. 2006;308(1-2):53-67.
100. Kantakamalakul W, Pattanapanyasat K, Jongrakthaitae S, Assawadarachai V, Ampol S, Sutthent R. A novel EGFP-CEM-NK<sub>r</sub> flow cytometric method for measuring antibody dependent cell mediated-cytotoxicity (ADCC) activity in HIV-1 infected individuals. *Journal of Immunological Methods*. 2006;315(1-2):1-10.
101. Richard J, Veillette M, Batraverse LA, Coutu M, Chapleau JP, Bonsignori M, et al. Flow cytometry-based assay to study HIV-1 gp120 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses. *Journal of Virological Methods*. 2014;208:107-14.
102. Parekh BS, Berger E, Sibley S, Cahya S, Xiao L, LaCerte MA, et al. Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay. *mAbs*. 2012;4(3):310-8.

103. Pollara J, Hart L, Brewer F, Pickeral J, Packard BZ, Hoxie JA, et al. High-throughput quantitative analysis of HIV-1 and SIV-specific ADCC-mediating antibody responses. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2011;79(8):603-12.
104. Howell DN, Andreotti PE, Dawson JR, Cresswell P. Natural killing target antigens as inducers of interferon: Studies with an immunoselected, natural killing-resistant human T lymphoblastoid cell line. *The Journal of Immunology*. 1985;134(2):971-6.
105. Hernandez MD, Sherman KE. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2011;6(6):478-82.
106. Fevrier M, Dorgham K, Rebollo A. CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. *Viruses*. 2011;3(5):586-612.
107. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunology Reviews*. 2013;254(1):54-64.
108. Rockstroh JK, Spengler U. HIV and hepatitis C virus co-infection. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004;4(7):437-44.
109. Qurishi N, Kreuzberg C, Lüchters G, Effenberger W, Kupfer B, Sauerbruch T, et al. Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *The Lancet*. 2003;362(9397):1708-13.
110. Kim AY, Schulze zur Wiesch J Fau - Kuntzen T, Kuntzen T Fau - Timm J, Timm J Fau - Kaufmann DE, Kaufmann De Fau - Duncan JE, Duncan Je Fau - Jones AM, et al. Impaired hepatitis C virus-specific T cell responses and recurrent hepatitis C virus in HIV coinfection. *PLoS Medicine*. 2006;3(12):e492.
111. Bailey JR, Dowd KA, Snider AE, Osburn WO, Mehta SH, Kirk GD, et al. CD4+ T-Cell-Dependent Reduction in Hepatitis C Virus-Specific Neutralizing Antibody Responses After Coinfection With Human Immunodeficiency Virus. *The Journal of Infectious Diseases*. 2015;212(6):914-23.
112. Lee S, Laiman A, French MA, Flexman J, Watson MW, Price P. The dynamics of HCV-specific antibody responses in HIV/HCV patients on long-term antiretroviral therapy. *Clinical Immunology*. 2017;179:54-63.
113. Mor G. *Immunology of Pregnancy*. Georgetown, Texas, USA: Springer 2006. 338 p.
114. Indolfi G, Azzari C, Resti M. Hepatitis: Immunoregulation in pregnancy and perinatal transmission of HCV. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*. 2014;11(1):6-7.
115. Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, et al. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *The Lancet*. 1992;340(8821):697-8.
116. Brillanti S, Foli M, Gaiani S, Masci C, Miglioli M, Barbara L. Persistent hepatitis C viraemia without liver disease. *The Lancet*. 1993;341(8843):464-5.
117. Collier J, Heathcote J. Hepatitis C viral infection in the immunosuppressed patient. *Hepatology*. 1998;27(1):2-6.
118. Honegger JR, Kim S, Price AA, Kohout JA, McKnight KL, Prasad MR, et al. Loss of immune escape mutations during persistent HCV infection in pregnancy enhances replication of vertically transmitted viruses. *Nature medicine*. 2013;19(11):1529-33.
119. Lin H-H, Kao J-H. Hepatitis C virus load during pregnancy and puerperium. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2000;107(12):1503-6.
120. Troesch M, Jalbert E, Canobio S, Boulassel MR, Routy J-P, Bernard NF, et al. Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C

- virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS*. 2005;19(8):775-84.
121. Giugliano S, Petroff MG, Warren BD, Jasti S, Linscheid C, Ward A, et al. Hepatitis C virus sensing by human trophoblasts induces innate immune responses and recruitment of maternal NK cells: potential implications for limiting vertical transmission. *The Journal of Immunology*. 2015;195(8):3737-47.
122. Hurtado CW, Golden-Mason L, Brocato M, Krull M, Narkewicz MR, Rosen HR. Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C--seropositive mother-infant dyads. *PLoS One*. 2010;5(8):e12232.
123. Roberts SS, Miller RK, Jones JK, Lindsay KL, Greene MF, Maddrey WC, et al. The ribavirin pregnancy registry: Findings after 5 years of enrollment, 2003-2009. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2010;88(7):551-9.
124. Feld JJ, Jacobson IM, Sulkowski MS, Poordad F, Tatch F, Pawlotsky JM. Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Liver International*. 2017;37(1):5-18.
125. Clonase Enzymes: ThermoFisher Scientific; [13-04-2017]. Available from: <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/clonase-enzyme.html>.
126. Cocquerel L, Op de Beeck A, Lambot M, Roussel J, Delgrange D, Pillez A, et al. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *The EMBO Journal*. 2002;21:2893-902.
127. Larouche A, Gaetan G, El-Bilali N, Quesnel-Vallieres M, Martin SR, Alvarez F, et al. Seronegative hepatitis C virus infection in a child infected via mother-to-child transmission. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(7):2515-9.
128. Nei M, Kumar S. *Synonymous and Nonsynonymous Nucleotide Substitutions. Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000. p. 332.
129. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*. 1986;3(5):418-26.
130. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science*. 1998;282(5390):938.
131. Sironi M, Cagliani R, Forni D, Clerici M. Evolutionary insights into host-pathogen interactions from mammalian sequence data. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16(4):224-36.
132. Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstetrics & Gynecology*. 2009;114(6):1326-31.
133. Duesberg U, Schneiders AM, Flieger D, Inchauspé G, Sauerbruch T, Spengler U. Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2001;35(5):650-7.
134. Oliviero B, Mantovani S, Varchetta S, Mele D, Grossi G, Ludovisi S, et al. Hepatitis C virus-induced NK cell activation causes metzincin-mediated CD16 cleavage and impaired antibody-dependent cytotoxicity. *Journal of Hepatology*. 2017.
135. Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut*. 2006;55(6):869-77.
136. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001;195:35-42.

137. Lunemann S, Malone DF, Hengst J, Port K, Grabowski J, Deterding K, et al. Compromised function of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(9):1362-73.
138. Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, Michelone G, Zaramella M, Mavilio D, et al. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology*. 2009;137(3):1151-60, 60 e1-7.
139. Deng L, Ma L, Virata-Theimer ML, Zhong L, Yan H, Zhao Z, et al. Discrete conformations of epitope II on the hepatitis C virus E2 protein for antibody-mediated neutralization and nonneutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2014;111(29):10690-5.
140. Zhang P, Wu CG, Mihalik K, Virata-Theimer ML, Yu MY, Alter HJ, et al. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2007;104(20):8449-54.
141. Tarr AW, Urbanowicz RA, Jayaraj D, Brown RJ, McKeating JA, Irving WL, et al. Naturally occurring antibodies that recognize linear epitopes in the amino terminus of the hepatitis C virus E2 protein confer noninterfering, additive neutralization. *Journal of Virology*. 2012;86(5):2739-49.
142. Richard J, Veillette M, Ding S, Zoubchenok D, Alshafi N, Coutu M, et al. Small CD4 mimetics prevent HIV-1 uninfected bystander CD4 + T cell killing mediated by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *EBioMedicine*. 2016;3:122-34.
143. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*. 2001;22(11):633-40.
144. Pelletier S, Drouin C, Bedard N, Khakoo SI, Bruneau J, Shoukry NH. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *Journal of Hepatology*. 2010;53(5):805-16.
145. Qin JY, Zhang L, Clift KL, Huler I, Xiang AP, Ren BZ, et al. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*. 2010;5(5):e10611.
146. Shearer RF, Saunders DN. Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: lentivirus and alternatives. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2015;20(1):1-10.
147. Hsu CC, Li HP, Hung YH, Leu YW, Wu WH, Wang FS, et al. Targeted methylation of CMV and E1A viral promoters. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2010;402(2):228-34.
148. Duvet S, Cocquerel L Fau - Pillez A, Pillez A Fau - Cacan R, Cacan R Fau - Verbert A, Verbert A Fau - Moradpour D, Moradpour D Fau - Wychowski C, et al. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(48):32088-95.
149. Galy O, Petit MA, Benjelloun S, Chevallier P, Chevallier M, Srivatanakul P, et al. Efficient hepatitis C antigen immunohistological staining in sections of normal, cirrhotic and tumoral liver using a new monoclonal antibody directed against serum-derived HCV E2 glycoproteins. *Cancer Letters*. 2007;248(1):81-8.
150. Naas T, Ghorbani M, Alvarez-Maya I, Lapner M, Kothary R, De Repentigny Y, et al. Characterization of liver histopathology in a transgenic mouse model expressing genotype 1a hepatitis C virus core and envelope proteins 1 and 2. *Journal of General Virology*. 2005;86:2185-96.

151. Verslype C, Nevens F, Sinelli N, Clarysse C, Pirenne J, Depla E, et al. Hepatic immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against HCV-E2 to evaluate antiviral therapy and reinfection of liver grafts in hepatitis C viral infection. *Journal of Hepatology*. 2003;38(2):208-14.
152. Ke P-Y, Chen SSL. Active RNA replication of hepatitis C virus downregulates CD81 expression. *PLoS One*. 2013;8(1):e54866.
153. Rosa D, Campagnoli S Fau - Moretto C, Moretto C Fau - Guenzi E, Guenzi E Fau - Cousens L, Cousens L Fau - Chin M, Chin M Fau - Dong C, et al. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 1996;93(1759-1763).
154. Lee HS, Qi Y, Im W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Scientific Reports*. 2015;5:8926.
155. Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, et al. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *Journal of Biotechnology*. 2012;161(3):336-48.
156. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*. 2009;4(7):837-56.
157. Lapierre P, Troesch M, Alvarez F, Soudeyns H. Structural Basis for Broad Neutralization of Hepatitis C Virus Quasispecies. *PLoS One*. 2011;6(10):e26981.
158. Liu L, Fisher BE, Thomas DL, Cox AL, Ray SC. Spontaneous clearance of primary acute hepatitis C virus infection correlated with high initial viral RNA level and rapid HVR1 evolution. *Hepatology*. 2012;55(6):1684-91.
159. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. 2000;288:339-44.
160. Osburn WO, Snider AE, Wells BL, Latanich R, Bailey JR, Thomas DL, et al. Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology*. 2014;59(6):2140-51.
161. Farci P, Quinti I, Farci S, Alter HJ, Strazzera R, Palomba E, et al. Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2006;103(22):8475-80.
162. Ruiz-Extremera Á, Muñoz-Gámez JA, Abril-Molina A, Salmerón-Ruiz MA, Muñoz-de-Rueda P, Pavón-Castillero EJ, et al. Variation of transaminases, HCV-RNA levels and Th1/Th2 cytokine production during the post-partum period in pregnant women with chronic hepatitis C. *PLoS One*. 2013;8(10):e75613.
163. Indolfi G, Azzari C, Moriondo M, Lippi F, de Martino M, Resti M. Alanine transaminase levels in the year before pregnancy predict the risk of hepatitis C virus vertical transmission. *Journal of Medical Virology*. 2006;78(7):911-4.
164. Hayashida A, Inaba N, Oshima K, Nishikawa M, Shoda A, Hayashida S, et al. Re-evaluation of the true rate of hepatitis C virus mother-to-child transmission and its novel risk factors based on our two prospective studies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2007;33(4):417-22.
165. Bhoopat L, Khunamornpong S, Sirivatanapa P, Rithaporn T, Lerdsrimongkol P, Thorner PS, et al. Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human

immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period. *Modern Pathology*. 2005;18(10):1357-64.

166. Kwiek JJ, Mwapasa V, Milner DA, Jr., Alker AP, Miller WC, Tadesse E, et al. Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. *PLoS Medicine*. 2006;3(1):e10.

167. Fauteux-Daniel S. Étude du goulot d'étranglement dans la transmission mère-enfant du virus de l'hépatite C: Université de Montréal; 2014.

168. Kalk E, Schubert P, Bettinger JA, Cotton MF, Esser M, Slogrove A, et al. Placental pathology in HIV infection at term: a comparison with HIV-uninfected women. *Tropical Medicine & International Health*. 2017;22(5):604-13.

169. Helle F, Vieyres G, Elkrief L, Popescu CI, Wychowski C, Descamps V, et al. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *Journal of Virology*. 2010;84(22):11905-15.

## Annexes

### 1. Vérification des vecteurs utilisés dans le projet sur l'ADCC

Tableau SI. Enzymes, amorces de séquençage et produits de digestion attendus pour les vecteurs utilisés dans le projet sur l'ADCC

Vecteurs	Enzymes de digestion	Longueur des fragments d'ADN attendus (pb)	Amorces utilisées pour le séquençage
670-E1E2	KpnI	6126+3885	Sens : 5'- CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3' Anti-sens: 5'- CACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT- 3'
529-E1E2	KpnI	6131+3885	Sens : 5'-TGGAGGACGGGGTGA ACTAC- 3' Anti-sens: 5'- CACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT- 3'
530-E1E2	KpnI	6131+4586	Sens : 5'-CTGGCCCACGGCGTACGCGTC- 3' Anti-sens : 5'-AGAGGTTGATTGTCTGAGCGGC-3'
VSV-G	KpnI	4213+1611	Sens : 5'- CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
Gagpol	KpnI	4936+3632+328	Sens : 5'- CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
Rev	EcoRI	3865+309	Sens : 5'-GCTCGATACAATAAACGCC- 3'
pENT	Sall	3504+998	Anti-sens: 5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
pDEST W-530	Sall	3504+998	
pCCIsin-GFP	EcoRI	5956+1869	

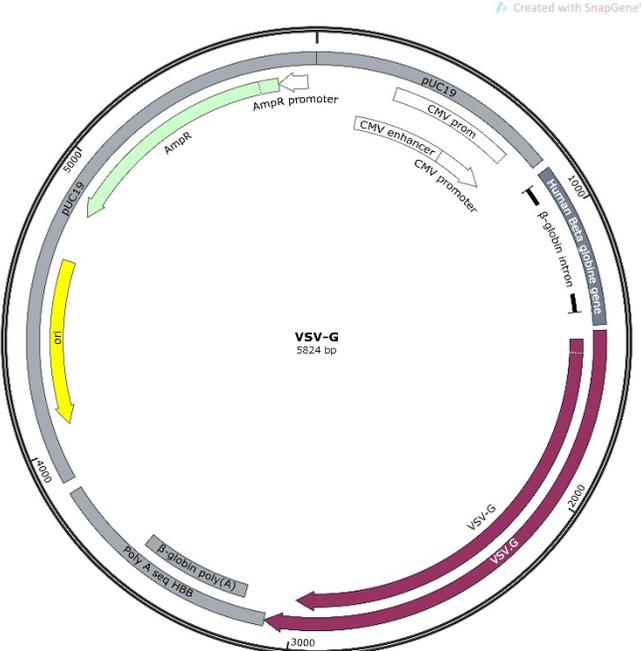
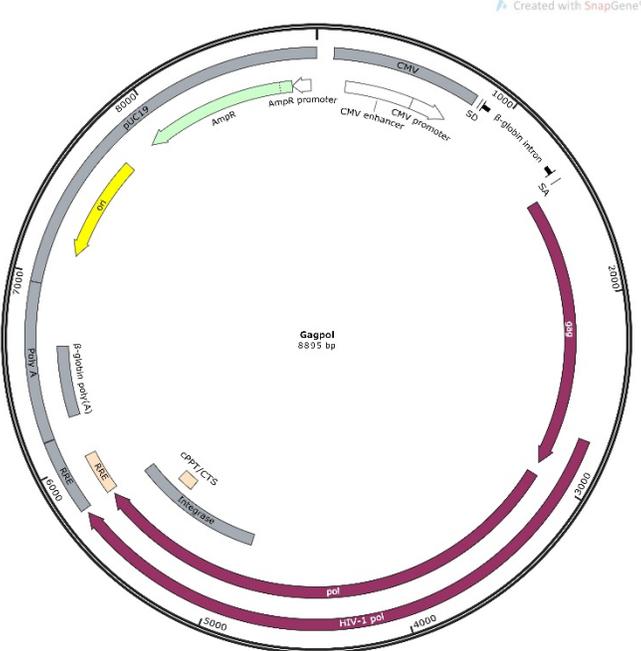
## 2. Séquence de la glycoprotéine d'enveloppe E1E2

5'-

CAGGTGCGCAACTCATCCGGTCTTTATCACGTTACAAATGACTGTCCAAACTCATC  
CATTGTCTATGAAGCTGCAGACGCCATTCTCCACACGCCTGGCTGCGTGCCCTGCG  
TGCGCGAGGGCAATGCTAGCCGATGTTGGGTCGCAGTCACTCCCACAGTAGCTAC  
CAGGGATGGGAAGCTGCCTACCACGCAGCTTAGGCGGCACATTGACCTGCTGGTG  
GGATCCGCCACCCTGTGTAGCGCCTTGTACGTGGGGGATCTGTGCGGCTCAGTTTT  
TCTGGTGGGCCAGCTGTTTACCTTCTCTCCCCGGCGCCACTGGACTACGCAGTCCT  
GTAATTGCTCCATCTATCCAGGGCACATCACGGGACATAGGATGGCCTGGGATAT  
GATGATGAATTGGAGTCCGACGGCTGCTCTCGTGGTCGCTCAATTGCTTAGGATCC  
CCCAGGCGATAATGGACATGATCGCAGGCGCCATTGGGGCGTGCTCGCGGGGAT  
AGCCTACTTTTCCATGGTGGGAAACTGGGCCAAGGTGCTGGTCGTTCTGTTGCTGT  
TCGCAGGAGTCGACGCGGAGACCCATGTGACAGGCGGCTCCGCTGGGCACACAA  
CTGCAGGTTTGGTGGGCCTCCTGACCCCTGGTGCTAAGCAAACATCCAGCTGAT  
AAACACTAATGGTAGTTGGCATATCAATAGCACAGCCCTCAACTGCAATGATAGT  
CTTACCCTGGCTGGCTCGCCGGACTCTTCTACAGGCACAAATTCAATAGCAGCG  
GTTGTCCGGAACGCCTGGCCTCTTGCCGGCGACTCACTGACTTTGCCCAAGGGTGG  
GGGCCTATTAGCTATGCTAACGGTTCCGGGCTGGATGAAAGGCCCTATTGTTGGC  
ACTACCCTCCCAGACCATGTGGGATCGTGCCCGCTAAATCCGTGTGCGGCCCGGT  
GTATTGCTTCACTCCCTCTCCCGTGGTGGTTGGCACTACAGACCGGTCTGGAGCTC  
CTACATACTCTTGGGGAGCCAATGATACCGATGTATTTCGTGCTGAATAACACAAG  
GCCTCCCTTGGGTAATTGGTTTGGGTGTACTTGGATGAACAGTACCGGCTTCACAA  
AGGTGTGCGGAGCCCCACCATGTGTCATCGGTGGTGTAGGAAATAATACTTCT  
GTGTCCTACAGACTGTTTCAGAAAACATCCCGAAGCCACCTACTCTCGATGCGGC  
AGCGGCCCATGGATTACCCCGAGATGCATGGTTGACTATCCTTACCGCCTGTGGC  
ATTACCCATGCACTATTAATACTATAACCATCTTTAAGGTTAGAATGTATGTGGGAGGA  
GTCGAGCATCGGCTCGAGGCCGCATGCAACTGGACTAGAGGCGAAAGATGTGATC  
TGGAGGACCGAGACAGGTCTGAACTCAGTCCTCTGCTGCTGAGCACCACCCAGTG  
GCAGGTTTTGCCATGCAGCTTTACCACACTTCCAGCACTGTCAACAGGACTTATCC  
ACCTCCACCAGAACATCGTTGATGTCCAGTACTTGTACGGCGTTGGGAGTTCAATT  
GCCTCATGGGCTATAAAATGGGAGTACGTAGTACTTCTGTTTCTGCTGCTCGCAGA  
TGCCAGAGTCTGCAGTTGCCTCTGGATGATGCTTCTCATTAGCCAAGCCGAGTAA-

3'

### 3. Carte génomique des vecteurs utilisés dans le projet d'ADCC



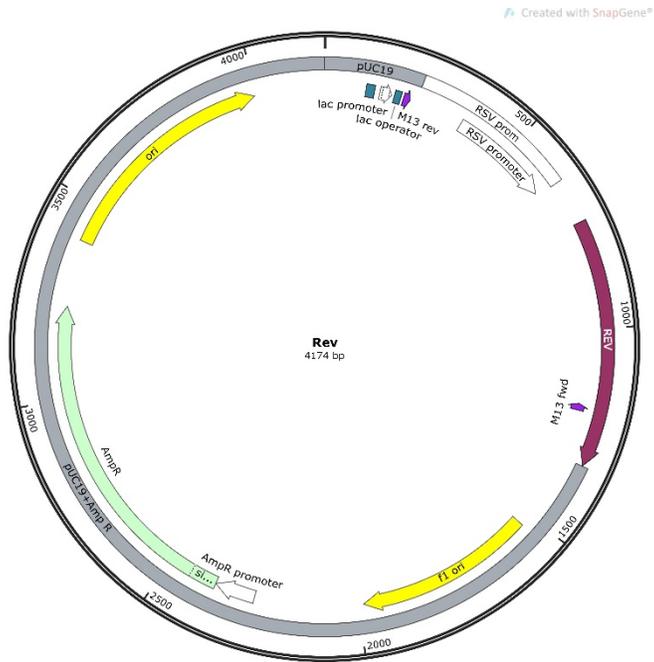
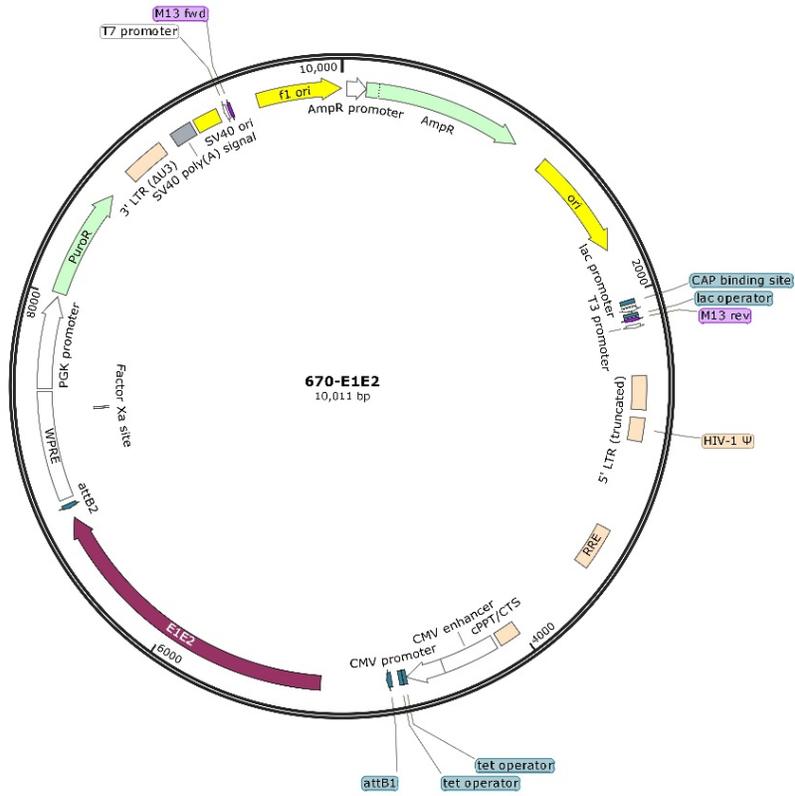
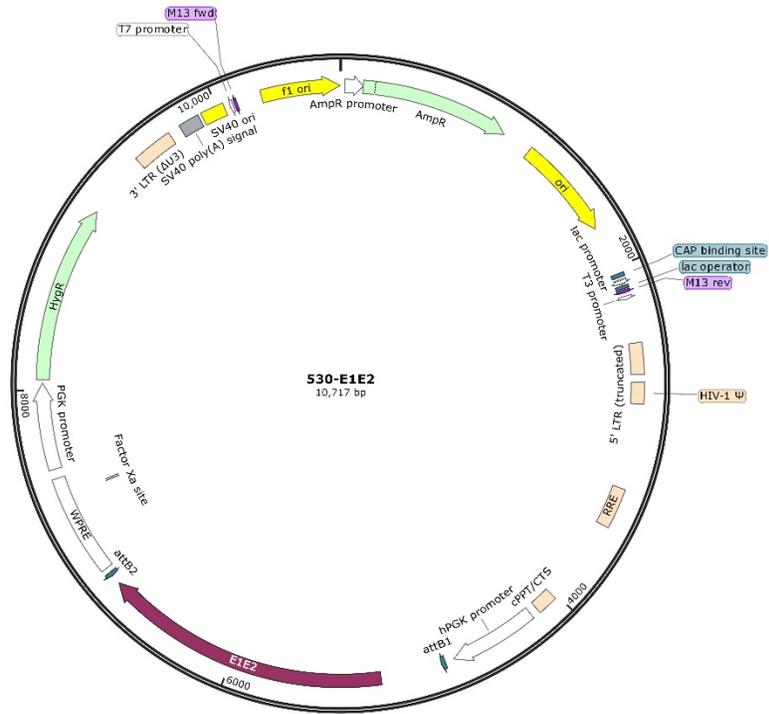


Figure S1. Vecteurs nécessaires à la construction des particules lentivirales



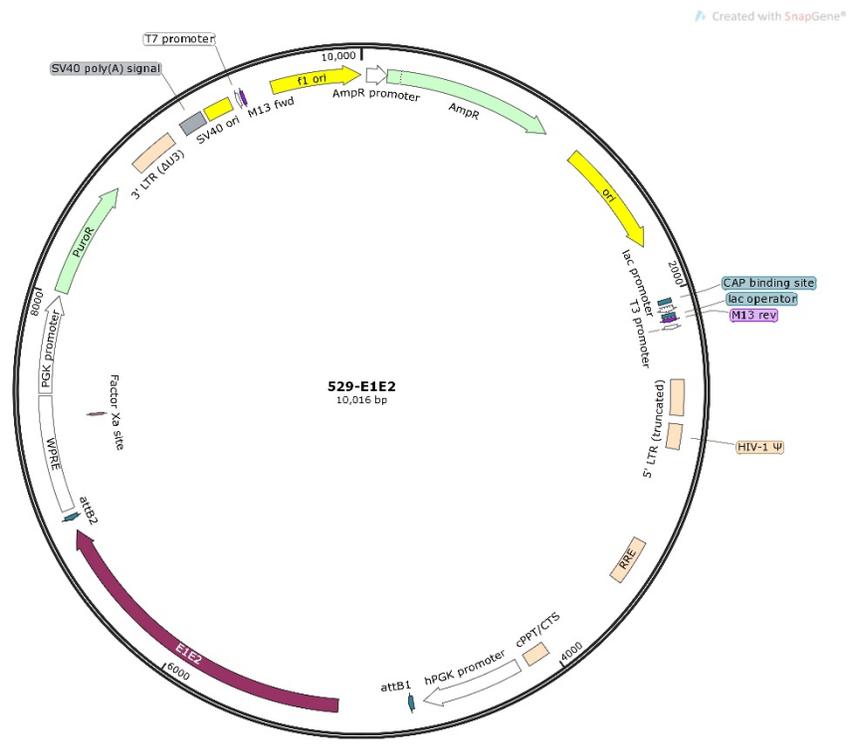
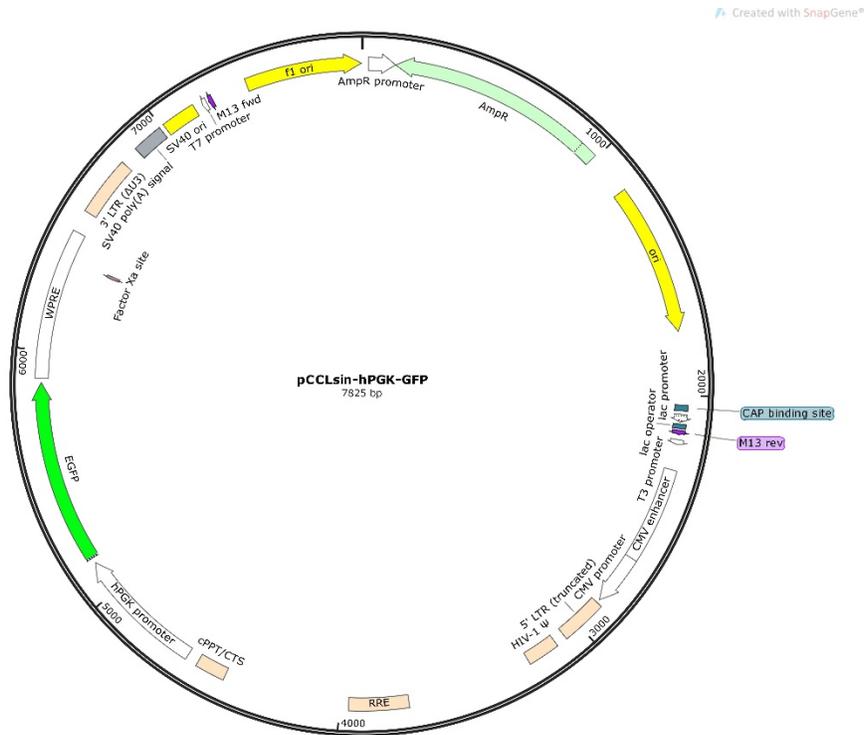
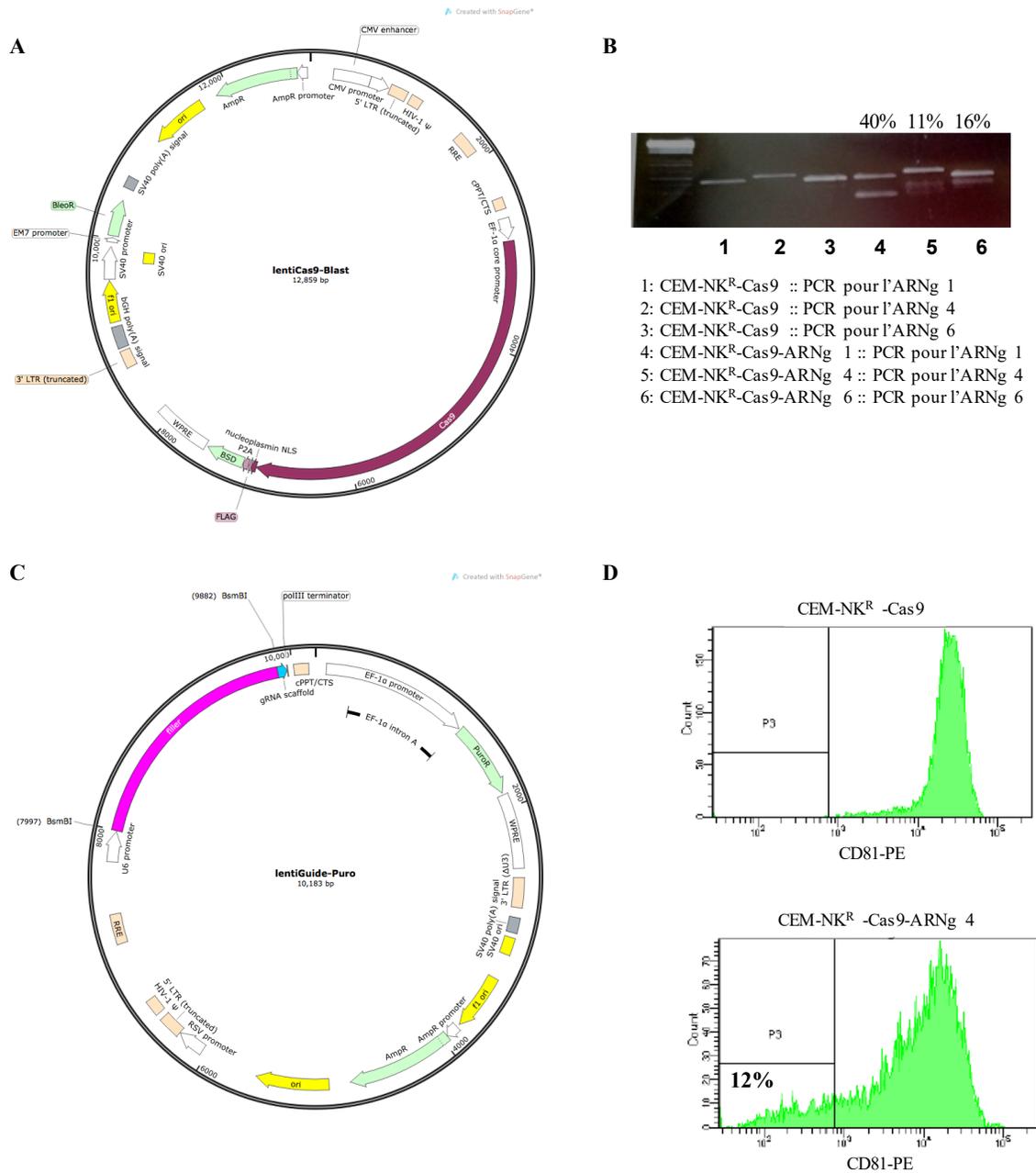


Figure S2. Vecteurs d'intégration des particules lentivirales

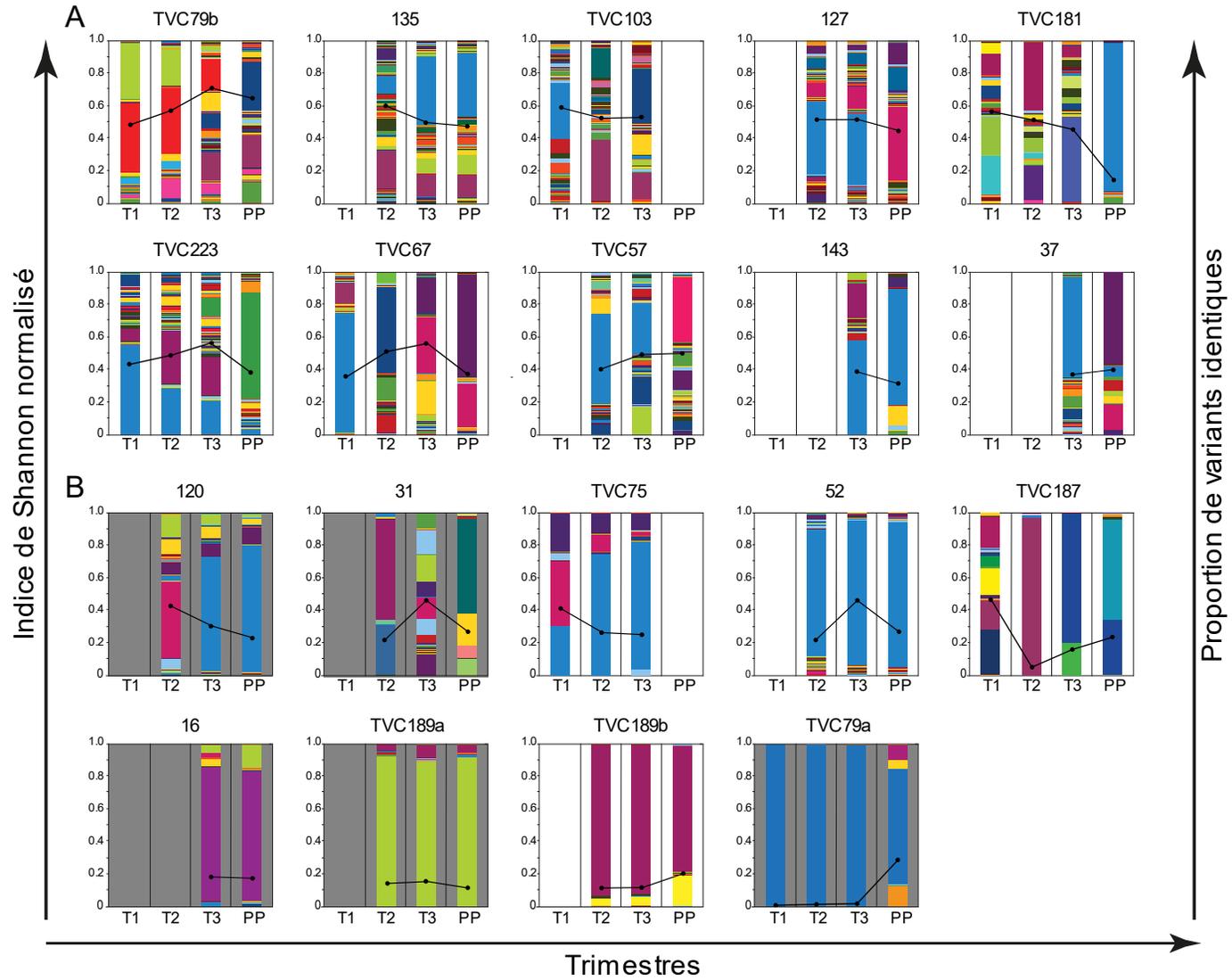
## 4. CRISPR-Cas9 : Système lentiviral créé par l'équipe du Dr Beauséjour



**Figure S3. Production de cellules CEM-NKR CD81- avec un système lentiviral de CRISPR-Cas9**

Des cellules CEM-NK<sup>R</sup> ont été infectées avec des particules lentivirales codant pour la nucléase Cas9 (A) et pour les ARNg 1, 4 ou 6 (C). La présence d'une délétion dans la séquence cible a été confirmée par un essai de mésappariements: l'ARNg 4 a donné le meilleur résultats avec un taux de 40% de clivage (B). La perte d'expression de CD81 dans cette condition a été confirmée en cytométrie en flux: 12% de la population était négative pour CD81 (D).

## 5. Profils de quasiespèce



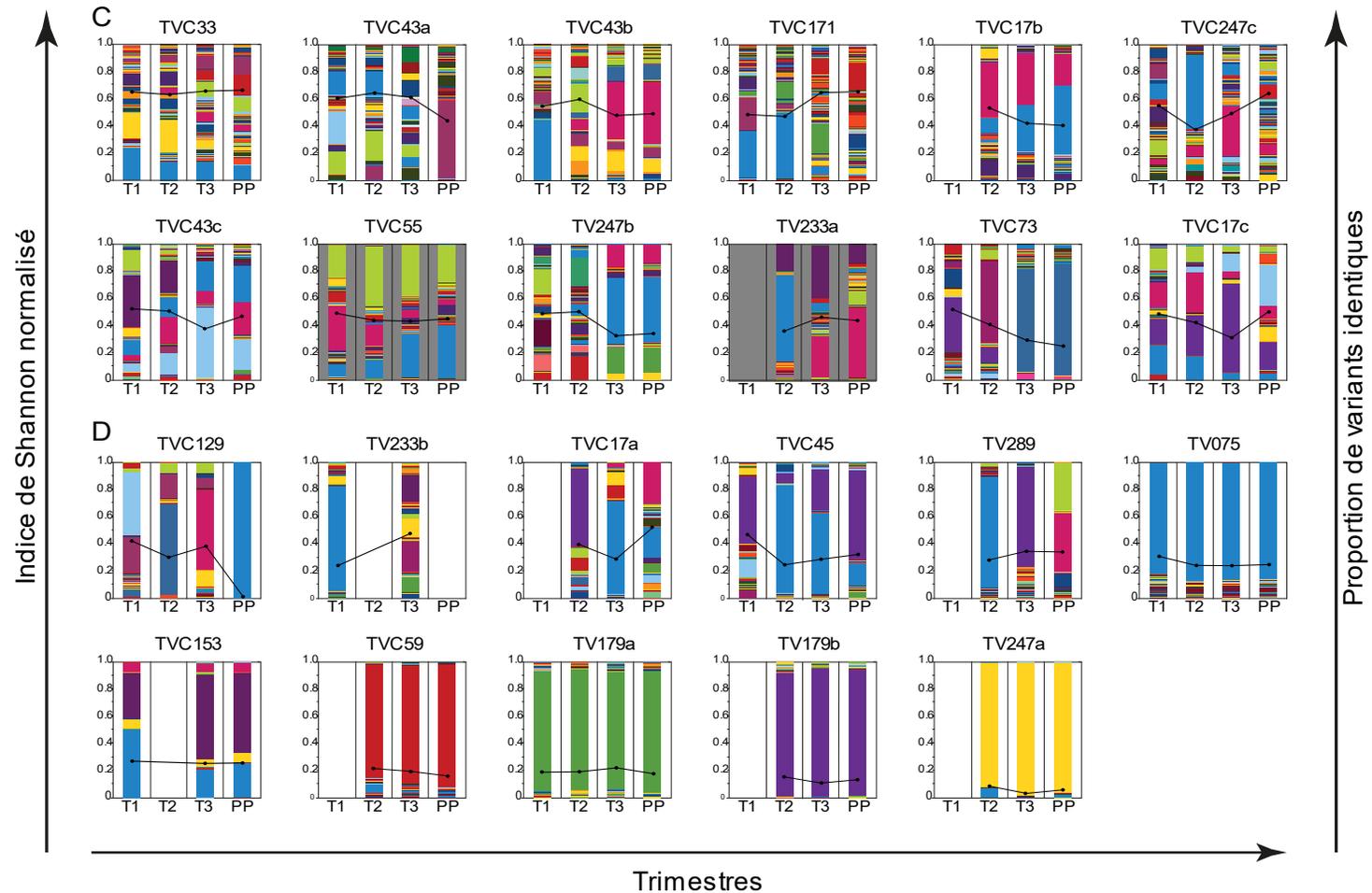


Figure S4. Profil de diversité de la quasiespèce des patientes mono-infectées (A, B) et co-infectées (C, D)

L'indice de Shannon normalisé est représenté sur l'axe des ordonnées gauche à chacun des trimestres de grossesse ou au PP. Les patientes de HD sont en (A et C) et les patientes de FD en (B et D). La proportion de chaque variante identique est représenté par une couleur distincte. Les profils de quasiespèces avec un fond gris pâle représentent les occurrences de TME.

## 6. Caractéristiques cliniques et expérimentales de la cohorte

Tableau SII. Caractéristiques cliniques et expérimentales de la cohorte

Patiente	Génotype	Statut de l'infection	TME	Échantillon	nombre de variants	Indice de Shannon			dN-dS		% de neutralisation		Virémie (IU/ml)		AST		ALT		
						Trimestres	Normalisé trimestre	Normalisé grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	
TVC181	1a	MONO	NON	1 <sup>er</sup>	80	2.49	0.57	0.51	0.09	1.24	98.27	96.08	244000.00	222104.00	26.00	24.00	45.00	38.67	
				2 <sup>e</sup>	56	2.08	0.52		-0.63		94.91		94868.00		21.00			32.00	
				3 <sup>e</sup>	98	2.10	0.46		0.34		95.05		510000.00		25.00			39.00	
				PP	36	0.53	0.15		-0.52		97.70		39548.00		91.00			218.00	
TVC57	1a	MONO	NON	2 <sup>e</sup>	177	2.09	0.40	0.45	2.03	2.76	79.84	79.04	3000000.00	3126666.67	21.00	23.00	27.00	28.50	
				3 <sup>e</sup>	217	2.66	0.49		2.68		78.25		3610000.00		25.00			30.00	
				PP	269	2.81	0.50		3.06		79.63		2770000.00		35.00			43.00	
TVC223	4k	MONO	NON	1 <sup>er</sup>	181	2.26	0.43	0.50	1.63	1.20	98.81	98.44	426579.52	416943.06	24.00	19.67	16.00	13.00	
				2 <sup>e</sup>	271	2.74	0.49		1.03		97.70		407380.28		16.00			10.00	
				3 <sup>e</sup>	303	3.23	0.57		1.31		98.81		416869.38		19.00			13.00	
				PP	127	1.86	0.38		0.95		96.48		n.d		27.00			22.00	
TVC67	1a	MONO	NON	1 <sup>er</sup>	25	1.16	0.36	0.48	-0.18	-0.33	81.01	82.23	72200.00	114275.00	28.00	31.33	63.00	59.00	
				2 <sup>e</sup>	32	1.78	0.51		-0.38		81.83		132000.00		37.00			74.00	
				3 <sup>e</sup>	44	2.13	0.56		-0.89		83.85		174000.00		29.00			40.00	
				PP	26	1.22	0.37		-0.65		76.20		78900.00		30.00			23.00	
TVC175	1a	MONO	NON	1 <sup>er</sup>	45	1.85	0.49	0.59	1.22	2.52	77.65	82.19	78600.00	110698.66	16.00	18.67	16.00	15.33	
				2 <sup>e</sup>	36	2.05	0.57		1.96		83.69		70327.00		20.00			15.00	
				3 <sup>e</sup>	59	2.90	0.71		2.93		85.23		146934.00		20.00			15.00	
				PP	63	2.69	0.65		3.08		80.15		146933.65		110.00			183.00	
127	1a	MONO	NON	2 <sup>e</sup>	181	2.69	0.52	0.52	1.25	1.03	95.17	92.82	116713.54	442548.84	27.00	33.00	26.00	26.00	
				3 <sup>e</sup>	226	2.81	0.52		0.95		90.48		612521.38		39.00			26.00	
				PP	277	2.52	0.45		-0.10		94.43		598411.60		n.d			n.d	
135	1a	MONO	NON	2 <sup>e</sup>	407	3.67	0.61	0.56	2.31	2.07	77.79	72.38	3069878.98	6309227.71	n.d	n.d	n.d	n.d	
				3 <sup>e</sup>	259	2.82	0.51		1.80		66.96		5213402.49		n.d			n.d	
				PP	347	2.83	0.48		1.47		73.73		10644401.68		n.d			n.d	
TVC187	1a	MONO	NON	1 <sup>er</sup>	88	2.09	0.47	0.23	-1.41	-0.78	95.74	94.73	655000.00	298750.00	35.00	32.67	51.00	45.67	
				2 <sup>e</sup>	52	0.21	0.05		-1.92		94.79		133000.00		37.00			50.00	
				3 <sup>e</sup>	32	0.56	0.16		-0.90		93.68		168702.00		26.00			36.00	
				PP	48	0.92	0.24		-0.81		93.87		238298.00		42.00			69.00	
31	2b	MONO	OUI	2 <sup>e</sup>	96	1.00	0.22	0.34	1.26	0.95	71.75	65.88	1726319.81	2708563.06	n.d	n.d	n.d	n.d	
				3 <sup>e</sup>	233	2.52	0.46		0.76		60.01		3690806.31		n.d			n.d	
				PP	142	1.34	0.27		0.93		91.33		n.d		n.d			n.d	
37	1a	MONO	NON	3 <sup>e</sup>	237	2.03	0.37	0.37	2.39	2.39	84.72	84.72	n.d	1161.45	n.d	n.d	n.d	n.d	
				PP	158	2.27	0.45		2.87		87.25		n.d		n.d			n.d	

Patiente	Génotype	Statut de l'infection	TME	Échantillon	nombre de variants	Indice de Shannon			dN-dS		% de neutralisation		Virémie (IU/ml)		AST		ALT	
						Trimestres	Normalisé trimestre	Normalisé grosse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse
120	3a	MONO	OUI	2 <sup>e</sup>	139	2.11	0.43	0.37	1.08	1.02	n.a	n.a	454068.37	1429221.09	n.d	44.00	n.d	48.00
				3 <sup>e</sup>	81	1.33	0.30		0.34		n.a		202824.89		44.00		48.00	
				PP	84	1.02	0.23		-0.05		n.a		3630770.00		n.d		n.d	
TVC189	4a	MONO	OUI	2 <sup>e</sup>	20	0.43	0.14	0.15	-2.36	-2.61	0.00	0.00	2090000.00	1428177.67	81.00	65.00	86.00	74.00
				3 <sup>e</sup>	19	0.46	0.16		-2.29		0.00		1648623.00		49.00		62.00	
				PP	26	0.38	0.12		-2.15		0.00		545910.00		55.00		61.00	
TVC219	4a	MONO	N	2 <sup>e</sup>	22	0.36	0.12	0.12	-3.61	-3.58	0.00	0.00	1584893.19	2081819.00	56.00	58.00	60.00	62.00
				3 <sup>e</sup>	37	0.43	0.12		-3.00		0.00		2910717.12		60.00		64.00	
				PP	41	0.76	0.20		-3.05		3.58		1749846.69		41.00		53.00	
TVC79	1a	MONO	OUI	1 <sup>er</sup>	23	0.02	0.01	0.01	-1.96	-1.59	0.00	5.33	226000.00	210250.00	35.00	27.33	44.00	27.67
				2 <sup>e</sup>	26	0.04	0.01		-1.53		5.56		109000.00		22.00		21.00	
				3 <sup>e</sup>	23	0.05	0.02		-0.29		10.42		301000.00		25.00		18.00	
				PP	37	1.03	0.29		2.34		0.77		205000.00		149.00		265.00	
143	3a	MONO	NON	3 <sup>e</sup>	55	1.56	0.39	0.39	0.56	0.56	n.a	n.a	300607.63	148111.75	26.00	26.00	14.00	14.00
				PP	14	0.02	0.01		-0.62		n.a		85113.80		n.d		n.d	
16	1a	MONO	OUI	3 <sup>e</sup>	103	0.85	0.18	0.18	1.22	1.22	99.52	99.52	493173.80	670203.87	n.d	n.d	n.d	n.d
				PP	75	0.43	0.10		-3.99		99.40		1083926.91		n.d		n.d	
52	3a	MONO	NON	2 <sup>e</sup>	92	1.35	0.30	0.24	-0.93	-1.24	n.a	n.a	212383.74	223015.41	n.d	n.d	n.d	n.d
				3 <sup>e</sup>	73	0.79	0.18		-3.09		n.a		267375.28		n.d		n.d	
				PP	66	0.74	0.18		-4.36		n.a		189287.20		n.d		n.d	
TVC75	1b	MONO	NON	1 <sup>er</sup>	27	1.36	0.41	0.31	-1.20	-0.91	89.34	87.55	195884.47	269428.46	22.00	22.33	37.00	27.67
				2 <sup>e</sup>	28	0.88	0.26		-0.85		84.85		179887.09		22.00		22.00	
				3 <sup>e</sup>	34	0.89	0.25		-0.28		88.48		432513.83		23.00		24.00	
TVC103	1a	MONO	NON	1 <sup>er</sup>	180	3.08	0.59	0.55	2.79	3.32	48.17	59.41	639734.84	787252.72	43.00	26.00	76.00	36.67
				2 <sup>e</sup>	170	2.71	0.53		2.97		64.40		1361444.68		18.00		18.00	
				3 <sup>e</sup>	154	2.69	0.53		2.92		65.68		360578.64		17.00		16.00	
TVC17	1a	CO	NON	2 <sup>e</sup>	171	2.04	0.40	0.34	1.43	2.06	67.44	62.45	1760000.00	2310000.00	34.00	31.50	35.00	31.00
				3 <sup>e</sup>	108	1.36	0.29		2.34		57.46		2050000.00		29.00		27.00	
				PP	149	2.62	0.52		2.00		89.19		3120000.00		117.00		178.00	
TVC117	1a	CO	NON	2 <sup>e</sup>	147	2.67	0.54	0.48	1.14	1.29	92.69	91.53	4940000.00	2794658.00	27.00	29.50	35.00	32.00
				3 <sup>e</sup>	140	2.09	0.42		0.90		90.37		2495291.00		32.00		29.00	
				PP	185	2.12	0.41		1.41		91.88		948683.00		68.00		60.00	
TVC137	1a	CO	NON	1 <sup>er</sup>	183	2.54	0.49	0.41	1.54	0.64	97.11	95.45	3670000.00	3030284.50	59.00	39.00	103.00	58.00
				2 <sup>e</sup>	69	1.80	0.43		-1.24		95.74		1016532.00		34.00		40.00	
				3 <sup>e</sup>	86	1.39	0.31		1.29		93.51		6320000.00		24.00		31.00	
				PP	112	2.37	0.50		0.77		90.88		1114606.00		53.00		51.00	

Patiente	Génotype	Statut de l'infection	TME	Échantillon	nombre de variants	Indice de Shannon			dN-dS		% de neutralisation		Virémie (IU/ml)		AST		ALT	
						Trimestres	Normalisé trimestre	Normalisé grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse
TV179	1b	CO	NON	1 <sup>er</sup>	71	0.81	0.19	0.20	-3.17	-2.29	15.03	15.11	1790000.00	2641525.00	385.00	192.33	337.00	138.33
				2 <sup>e</sup>	76	0.83	0.19		-2.25		15.18		7300000.00		85.00		45.00	
				3 <sup>e</sup>	74	0.95	0.22		-1.64		n.d		1400000.00		107.00		33.00	
				PP	52	0.70	0.18		-1.60		n.d		76100.00		30.00		28.00	
TV399	1b	CO	NON	2 <sup>e</sup>	42	0.58	0.16	0.13	-3.38	-3.68	26.21	29.62	286000.00	662666.67	39.00	39.00	34.00	34.00
				3 <sup>e</sup>	38	0.40	0.11		-2.81		33.03		452000.00		n.d			
				PP	36	0.48	0.13		-2.27		20.52		1250000.00		51.00		37.00	
TVC153	1a	CO	NON	1 <sup>er</sup>	124	1.30	0.27	0.26	-0.30	-0.44	73.33	70.19	3460000.00	2564612.33	25.00	20.50	25.00	18.00
				3 <sup>e</sup>	131	1.24	0.25		-0.44		67.06		2110000.00		16.00		11.00	
				PP	145	1.28	0.26		-0.53		68.74		2123837.00		51.00		35.00	
TV289	1b	CO	NON	2 <sup>e</sup>	81	1.24	0.28	0.31	-0.46	1.34	86.41	86.95	2137962.09	1242620.70	82.00	98.50	54.00	51.50
				3 <sup>e</sup>	102	1.60	0.35		0.17		87.50		1520000.00		115.00		49.00	
				PP	138	1.89	0.38		-0.79		88.36		69900.00		n.d		n.d	
TV385	1b	CO	OUI	1 <sup>er</sup>	292	1.38	0.24	0.36	0.22	0.74	90.09	87.47	37420.00	19910.00	27.00	23.50	14.00	16.50
				3 <sup>e</sup>	427	2.89	0.48		1.01		84.85		2400.00		20.00		19.00	
TVC105	2r	CO	NON	1 <sup>er</sup>	1132	3.89	0.55	0.47	2.73	2.49	41.46	35.79	9550000.00	5202924.14	25.00	23.33	20.00	15.67
				2 <sup>e</sup>	450	2.30	0.38		2.71		32.24		2438491.55		21.00		12.00	
				3 <sup>e</sup>	934	3.38	0.49		2.23		33.66		7420000.00		24.00		15.00	
				PP	1698	4.77	0.64		2.01		46.10		1403205.00		32.00		17.00	
TV531	2r	CO	NON	1 <sup>er</sup>	460	3.00	0.49	0.44	2.28	2.01	45.53	38.27	903.00	789.73	29.00	32.00	20.00	18.00
				2 <sup>e</sup>	631	3.25	0.50		1.86		36.24		108000.00		n.d		n.d	
				3 <sup>e</sup>	171	1.68	0.33		-0.73		33.02		1540000.00		35.00		16.00	
				PP	225	1.86	0.34		-0.78		26.28		1510000.00		49.00		55.00	
TV247	2r	CO	NON	2 <sup>e</sup>	81	0.38	0.09	0.06	0.81	-0.97	16.54	11.81	n.d	208449.09	28.00		14.00	
				3 <sup>e</sup>	55	0.13	0.03		-2.40		7.08		208449.09		25.00		12.00	
				PP	60	0.24	0.06		-2.33		14.95		n.d		25.00		15.00	
TVC59	1a	Co	NON	2 <sup>e</sup>	87	0.97	0.22	0.21	-2.28	-3.14	4.16	2.08	1140568.00	2415687.00	67.00	52.50	59.00	48.00
				3 <sup>e</sup>	119	0.93	0.19		-2.82		0.00		3690806.00		38.00		37.00	
				PP	94	0.73	0.16		-2.97		7.48		8074604.00		65.00		59.00	
TVC73	3a	CO	NON	1 <sup>er</sup>	240	2.85	0.52	0.41	3.33	3.06	n.a	n.a	7210000.00	8586666.67	25.00	67.33	23.00	53.00
				2 <sup>e</sup>	152	2.06	0.41		2.25		n.a		4150000.00		90.00		68.00	
				3 <sup>e</sup>	178	1.53	0.30		2.20		n.a		14400000.00		87.00		68.00	
				PP	119	1.20	0.25		1.74		n.a		16700000.00		91.00		64.00	

Patiente	Génotype	Statut de l'infection	TME	Échantillon	nombre de variants	Indice de Shannon			dN-dS		% de neutralisation		Virémie (IU/ml)		AST		ALT	
						Trimestres	Normalisé trimestre	Normalisé grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse
TVC171	1a	CO	NON	1 <sup>er</sup>	335	2.83	0.49	0.54	1.28	1.87	94.90	94.21	5960000.00	9857045.75	44.00	43.67	55.00	50.33
				2 <sup>e</sup>	329	2.74	0.47		1.31		94.87		3864749.00		44.00		54.00	
				3 <sup>e</sup>	568	4.11	0.65		1.77		92.86		7364127.00		43.00		42.00	
				PP	659	4.25	0.65		1.89		90.14		22239307.00		43.00		28.00	
TVC55	1a	CO	OUI	1 <sup>er</sup>	199	2.61	0.49	0.46	2.05	1.56	74.30	76.41	5530000.00	4350000.00	20.00	23.67	21.00	20.00
				2 <sup>e</sup>	193	2.32	0.44		1.50		72.62		5220000.00		22.00		20.00	
				3 <sup>e</sup>	179	2.25	0.43		1.46		82.31		1910000.00		29.00		19.00	
				PP	206	2.41	0.45		1.30		89.13		4740000.00		29.00		27.00	
TVC45	3a	CO	NON	1 <sup>er</sup>	136	2.31	0.47	0.34	0.42	-0.19	n.a	n.a	1090000.00	3922750.00	36.00	30.67	45.00	30.33
				2 <sup>e</sup>	55	0.99	0.25		-0.82		n.a		661000.00		25.00		19.00	
				3 <sup>e</sup>	74	1.24	0.29		-0.96		n.a		10700000.00		31.00		27.00	
				PP	119	1.55	0.32		-0.24		n.a		3240000.00		49.00		43.00	
TVC167	4k	CO	NON	1 <sup>er</sup>	113	2.48	0.52	0.47	0.44	-0.41	82.04	83.84	207549.29	743954.35	39.00	35.00	50.00	34.67
				2 <sup>e</sup>	187	2.66	0.51		-0.43		85.19		1040210.55		22.00		16.00	
				3 <sup>e</sup>	129	1.84	0.38		-0.91		84.30		587489.35		44.00		38.00	
				PP	140	2.32	0.47		-0.75		84.22		1140568.19		58.00		53.00	
TV233	1b	CO	NON	2 <sup>e</sup>	69	1.53	0.36	0.41	1.67	1.66	87.67	86.99	499000.00	4203000.00	16.00	19.00	11.00	15.00
				3 <sup>e</sup>	124	2.23	0.46		1.47		86.31		6900000.00		22.00		19.00	
				PP	189	2.30	0.44		1.19		82.82		5210000.00		17.00		10.00	
TVC129	1b	CO	NON	1 <sup>er</sup>	118	2.01	0.42	0.37	0.86	0.47	93.26	92.29	7170000.00	7908055.35	226.00	204.00	284.00	225.00
				2 <sup>e</sup>	61	1.24	0.30		-1.57		90.98		8650000.00		192.00		185.00	
				3 <sup>e</sup>	73	1.64	0.38		-0.60		92.64		15800000.00		194.00		206.00	
				PP	6	0.02	0.01		-1.84		94.68		12221.41		46.00		38.00	
TVC113	4k	CO	NON	1 <sup>er</sup>	181	2.85	0.55	0.54	0.36	0.19	78.60	76.54	243849.15	204474.64	22.00	27.67	22.00	23.33
				2 <sup>e</sup>	138	2.95	0.60		0.10		80.96		73800.00		20.00		19.00	
				3 <sup>e</sup>	198	2.54	0.48		0.00		70.07		232874.13		41.00		29.00	
				PP	151	2.47	0.49		-0.18		75.99		267375.28		53.00		18.00	
TVC43	4k	CO	NON	1 <sup>er</sup>	131	2.96	0.61	0.62	-0.24	-0.49	53.28	49.85	443732.52	219110.61	24.00	26.00	20.00	21.33
				2 <sup>e</sup>	153	3.25	0.65		0.35		46.43		57163.82		22.00		16.00	
				3 <sup>e</sup>	150	3.07	0.61		-1.05		n.d		31100.00		32.00		28.00	
				PP	186	2.31	0.44		0.03		73.37		344446.09		28.00		27.00	
TV075	1a	CO	NON	1 <sup>er</sup>	37	1.12	0.31	0.26	-2.18	-1.89	1.18	5.78	569000.00	4658750.00	44.00	29.67	53.00	30.00
				2 <sup>e</sup>	27	0.80	0.24		-1.00		8.64		848000.00		21.00		21.00	
				3 <sup>e</sup>	29	0.81	0.24		-1.54		7.52		518000.00		24.00		16.00	
				PP	26	0.81	0.25		-3.10		5.95		16700000.00		33.00		23.00	

Patiente	Génotype	Statut de l'infection	TME	Échantillon	nombre de variants	Indice de Shannon			dN-dS		% de neutralisation		Virémie (IU/ml)		AST		ALT		
						Trimestres	Normalisé trimestre	Normalisé grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	Trimestres	Grossesse	
TVC33	3a	CO	NON	1 <sup>er</sup>	137	3.21	0.65	0.65	3.50	3.27	n.a	n.a	6380000.00	8393333.33	62.00	53.33	88.00	70.33	
				2 <sup>e</sup>	264	3.53	0.63			3.10		n.a		12300000.00		45.00		52.00	
				3 <sup>e</sup>	312	3.79	0.66			3.12		n.a		6500000.00		53.00		71.00	
				PP	197	3.52	0.67			2.87		n.a		8840000.00		44.00		45.00	

Total					Indice de Shannon			dN-dS		% de neutralisation		Virémie (IU/ml)		AST		ALT			
Total					42	42			42		42		36		42		37		37
Nombre d'échantillons selon la stratification	Cohorte	TME+	19	7			HD	22				Neutralisation +	25				ALT/AST	37	
		TME-	23	35			LD	20				Neutralisation -	11						
	Mono-infectées	TME+		5			HD	10				Neutralisation +	13				ALT/AST	14	
		TME-		14			LD	9				Neutralisation -	3						
	Co-infectées	TME+		2			HD	12				Neutralisation +	12				ALT/AST	23	
		TME-		21			LD	11				Neutralisation -	8						

Légende : n.d : non-disponible; n.a : non-applicable